

POLYPEPTIDES CAPABLES D'INTERAGIR AVEC LES MUTANTS
ONCOGENIQUES DE LA PROTEINE P53

La présente invention concerne le domaine de la biologie et de la régulation du cycle cellulaire. Plus particulièrement, la présente invention concerne de nouveaux polypeptides capables d'interagir spécifiquement avec les formes oncogéniques de la protéine p53.

La protéine p53 sauvage intervient dans la régulation du cycle cellulaire et dans le maintien de l'intégrité du génome de la cellule. Cette protéine, dont la fonction principale est d'être un activateur de la transcription de certains gènes, est susceptible de bloquer la cellule en phase G1 du cycle cellulaire lors de l'apparition de mutations au cours de la réplication du génome, et d'enclencher un certain nombre de processus de réparation de l'ADN. Ce blocage en phase G1 est dû principalement à l'activation du gène *p21/WAF1*. De plus, en cas de mauvais fonctionnement de ces processus de réparation ou en cas d'apparition d'évènements mutationnels trop nombreux pour être corrigés, cette protéine est capable d'induire le phénomène de mort cellulaire programmée, appelé apoptose.

De cette façon, la protéine p53 agit comme un supresseur de tumeur, en éliminant les cellules anormalement différenciées ou dont le génome a été endommagé.

La protéine p53 comporte 393 acides aminés, qui définissent 5 domaines fonctionnels (voir Figure 1) :

- le domaine activateur de la transcription, constitué par les acides aminés 1 à 73, capable de lier certains facteurs de la machinerie générale de transcription comme la protéine TBP. Ce domaine est aussi le siège d'un certain nombre de modifications post-traductionnelles. Il est également le siège de nombreuses interactions de la protéine p53 avec de nombreuses autres protéines et notamment avec la protéine cellulaire MDM2 ou la protéine EBNA5 du virus d'Epstein-Barr (EBV), capables de

bloquer la fonction de la protéine sauvage. De plus, ce domaine possède des séquences d'acides aminés dites PEST de susceptibilité à la dégradation protéolytique.

- le domaine de liaison à l'ADN, localisé entre les acides aminés 73 et 315. La conformation de ce domaine central de p53 régule la reconnaissance de séquences d'ADN spécifiques de la protéine p53. Ce domaine est le siège de deux types d'altérations affectant la fonction de la protéine sauvage :

(i) l'interaction avec des protéines bloquant la fonction de la protéine p53 comme l'antigène 'grand T' du virus SV40 ou les protéines virales E6 des virus HPV16 et HPV18 capables de provoquer sa dégradation par le système de l'ubiquitine. Cette dernière interaction ne peut se faire qu'en présence de la protéine cellulaire E6ap (enzyme E3 de la cascade de l'ubiquitination).

(ii) les mutations ponctuelles qui affectent la fonction de la protéine p53 et dont la quasi-totalité observée dans les cancers humains sont localisées dans cette région.

- le signal de localisation nucléaire, constitué des acides aminés 315 à 325, indispensable au bon adressage de la protéine dans le compartiment où elle va exercer sa principale fonction.

- le domaine d'oligomérisation, constitué des acides aminés 325 à 355. Cette région 325 à 355 forme une structure de type : feuillet β (326-334)-coude (335-336)-hélice α (337-355). Les altérations de fonctions localisées dans cette région sont essentiellement dues à l'interaction de la protéine sauvage avec les différentes formes mutantes qui peuvent conduire à des effets variables sur la fonction de la protéine sauvage.

- le domaine de régulation, constitué des acides aminés 365 à 393, qui est le siège d'un certain nombre de modifications post-traductionnelles (glycosylations,

phosphorylations, fixation d'ARN,...) qui modulent la fonction de la protéine p53 de façon positive ou négative. Ce domaine joue un rôle extrêmement important dans la modulation de l'activité de la protéine sauvage.

Le fonctionnement de la protéine p53 peut être perturbé de différentes façons :

- 5 - par le blocage de sa fonction par un certain nombre de facteurs comme par exemple l'antigène 'grand T' du virus SV40, la protéine EBNA5 du virus d'Epstein-Barr, ou la protéine cellulaire MDM2.

- 10 - par la déstabilisation de la protéine par augmentation de sa susceptibilité à la protéolyse, notamment par interaction avec la protéine E6 des virus du papillome humain HPV16 et HPV18, qui favorise l'entrée de la p53 dans le cycle d'ubiquitination. Dans ce cas l'interaction entre ces deux protéines ne peut se faire que par la fixation préalable d'une protéine cellulaire, la protéine E6ap dont le site de fixation est mal connu.

- par des mutations ponctuelles au niveau du gène de la protéine p53.

- 15 - par délétion d'un ou des deux allèles de p53

- 20 Les deux derniers types de modifications sont retrouvés dans environ 50% des différents types de cancer. A cet égard, les mutations du gène de la protéine p53 repertoriées dans les cellules cancéreuses touchent une très grande partie du gène codant pour cette protéine, et ont pour résultats des modifications variables du fonctionnement de cette protéine. On peut cependant noter que ces mutations sont en grande majorité localisées dans la partie centrale de la protéine p53 dont on sait qu'elle est la région de contact avec les séquences génomiques spécifiques de la protéine p53. Ceci explique pourquoi la plupart des mutants de la protéine p53 ont comme principale caractéristique de ne plus pouvoir se fixer aux séquences d'ADN
- 25 que reconnaît la protéine sauvage et ainsi de ne plus pouvoir exercer leur rôle de facteur de transcription.

On regroupe actuellement l'ensemble de ces modifications dans deux catégories :

- les mutants dits faibles, dont le produit est une protéine non-fonctionnelle, qui, dans le cas de mutation sur un seul des deux allèles, n'affecte pas le fonctionnement de la protéine sauvage codée par l'autre allèle. Le principal
5 représentant de cette catégorie est le mutant H273 spécifique du syndrome familial de Li-Fraumeni d'hypersensibilité aux affections cancéreuses.

- les mutants dominant-oncogéniques, dont le produit est une protéine qui a perdu la capacité de se lier à l'ADN et qui participe activement à la transformation néoplasique. Les mutants de cette catégorie ont perdu leur capacité transactivatrice et
10 sont plus stables que la protéine sauvage. Ils sont incapables d'inhiber la transformation des fibroblastes embryonnaires de rat et ils fonctionnent comme oncogènes en coopérant avec la forme activée de RAS dans la transformation de fibroblastes embryonnaires de rat (Eliyahu et al, Nature 312 (1984) 646 / Parada et al, Nature 312 (1984) 649). Ce comportement peut être expliqué par deux mécanismes
15 différents non exclusifs l'un de l'autre ;

(i) ces mutants génèrent une protéine non-fonctionnelle, qui, dans le cas de mutation sur un seul des deux allèles et par interaction avec la protéine sauvage, est capable de bloquer le fonctionnement de celle-ci par formation d'oligomères mixtes non-actifs qui ne peuvent plus se fixer aux séquences d'ADN
20 spécifiques de la protéine sauvage. Un tel mécanisme est invoqué dans le cas où l'on observe la transformation maligne des cellules après transfection des mutants en présence de p53 endogène.

(ii) ces mutants peuvent de plus présenter un phénotype "gain de fonction". Leur expression dans des cellules non tumorigènes n'exprimant pas de p53
25 endogène conduit à l'apparition de tumeurs chez la souris athymique (Dittmer et al, Nature Genetics 4 (1993) 42). Ces mutants sont capables d'activer la transcription des gènes comme MDR ou PCNA n'ayant pas de séquences consensus reconnues par

p53 ; activation qui se fait probablement par recrutement des facteurs de transcription spécifiques des mutants et qui peut participer à l'apparition du phénotype tumoral (Chin et al, Science 255 (1992) 459; Deb et al, J. Virol. 66 (1992) 6164). Enfin, il a été rapporté récemment que ces mutants peuvent perturber l'attachement de certaines
5 régions de l'ADN (MAR/SAR) au réseau de la matrice nucléaire (Müller et al, Oncogene 12 (1996) 1941).

De nombreux partenaires cellulaires ont été décrits pour la protéine p53. Certains interagissent aussi bien avec les conformations sauvage et mutées de la protéine et d'autres sont spécifiques de l'une ou l'autre des conformations (Iwabuchi
10 et al, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91 (1994) 6098). Il est concevable que certaines de ces propriétés 'gain de fonction' puissent être médiées par des partenaires protéiques spécifiques des mutants de p53, cependant de tels partenaires n'ont encore jamais été identifiés. L'identification de tels partenaires permettrait de nouvelles approches dans les thérapies anti-cancéreuses basées sur la modification ou le contrôle de ces
15 interactions et sur l'obtention de composés capables d'interférer dans l'interaction de ces partenaires protéiques avec les différentes formes de p53. La présente invention satisfait ce besoin et apporte en outre d'autres avantages.

Dans le but d'étudier ce phénotype "gain de fonction" susceptible d'impliquer des interactions protéine-protéine spécifiques de ce type de mutant, le système
20 double-hybride a été utilisé pour rechercher des partenaires spécifiques du mutant H175, principal représentant de cette catégorie de mutants. Une banque de cDNA d'embryon de souris, fusionnée à la séquence du domaine de transactivation de *GAL4* (TA), a été criblée dans la souche de levure YCM17 en utilisant comme protéine appât le domaine 73-393 du mutant H175 fusionné au domaine de liaison à l'ADN de
25 Gal4 (DB). Ce criblage a permis d'isoler deux cDNA codant pour deux protéines différentes : la protéine MBP1 et la Fibuline-2..

Les interactions entre ces deux protéines et le mutant H175 de la protéine p53 ont pu être confirmées en cellules mammifères et des effets fonctionnels ont pu être

démontrés, aussi bien sur des propriétés de la forme mutée de la p53 que sur des propriétés de la forme sauvage.

La présente invention résulte donc de la mise en évidence par la demanderesse de nouveaux polypeptides capables d'interagir spécifiquement avec différentes formes de la protéine p53. Plus précisément la présente invention résulte de l'identification, l'isolement et la caractérisation d'une nouvelle protéine et du gène correspondant, la dite protéine étant caractérisée en ce qu'elle est capable d'interagir spécifiquement avec les formes oncogéniques de p53 et avec les mutants H175 et G281 en particulier. Cette protéine est appelée MBP1 pour p53 Mutant Binding Protein. La présente invention résulte également de la mise en évidence qu'une autre protéine, la fibuline2, est capable d'interagir spécifiquement avec les formes oncogéniques de p53 et avec les mutants H175 et G281 en particulier.

La présente invention résulte également de la découverte des propriétés particulières de ces nouveaux partenaires protéiques de p53 qui de manière inattendue s'avèrent également être capables de bloquer les effets anti-prolifératifs de la forme sauvage de p53.

Ces nouveaux partenaires protéiques de p53 présentent en outre une synergie d'action très importante avec les mutants oncogéniques de p53, cette synergie s'exerce aussi bien pour la coopération oncogénique avec la forme activée de la protéine Ras que sur l'effet prolifératif des formes mutées de p53.

De plus et indépendamment de toute interaction avec p53, ces polypeptides présentent un effet positif sur la croissance cellulaire. En outre, un de ces partenaires, la protéine MBP1, présente les caractéristiques d'un oncogène immortalisant en coopérant avec la forme activée de la protéine Ras pour la transformation cellulaire.

De part la spécificité et les effets synergiques que présentent ces nouveaux partenaires de p53 vis à vis de certaines formes mutées de p53, ces polypeptides constituent une cible thérapeutique de choix pour le traitement des cancers liés aux

mutations de la protéine p53.

En outre, ces polypeptides qui présentent des propriétés oncogéniques intrinsèques, constituent de nouvelles cibles potentielles pour le traitement du cancer en général.

- 5 Un premier objet de l'invention concerne donc des polypeptides capables d'interagir spécifiquement avec les formes oncogéniques de p53. Ces polypeptides sont en outre capables de stimuler la croissance cellulaire et de bloquer les effets anti-prolifératifs de la forme sauvage de p53.

- 10 Selon un premier mode de réalisation, ces polypeptides comprennent tout ou partie d'une séquence choisie parmi les séquences polypeptidiques SEQ ID N° 9 (fragment C-terminal de MBP1 murine) ou SEQ ID N°16 (MBP1 murine) ou un dérivé de celles-ci.

- 15 Selon un autre mode de réalisation, ces polypeptides comprennent tout ou partie d'une séquence choisie parmi les séquences polypeptidiques SEQ ID N°31 (fragment C-terminal MBP1 humaine) ou SEQ ID N°22 (MBP1 humaine) ou un dérivé de celles-ci.

Enfin selon encore un autre mode de réalisation, ces polypeptides comprennent tout ou partie de la séquence polypeptidique SEQ ID N° 33 (fragment C-terminal Fibuline-2 murine) ou un dérivé de celle-ci.

- 20 De manière préférée les polypeptides de l'invention sont représentés par la séquence polypeptidique SEQ ID N°22 ou ses dérivées

- 25 Au sens de la présente invention, le terme séquence polypeptidique dérivée désigne toute séquence polypeptidique différant de la séquence considérée, obtenue par une ou plusieurs modifications de nature génétique et/ou chimique, et possédant la capacité d'interagir avec les formes mutées oncogéniques de p53. Par modification

de nature génétique et/ou chimique, on peut entendre toute mutation, substitution, délétion, addition et/ou modification d'un ou plusieurs résidus. De tels dérivés peuvent être générés dans des buts différents, tels que notamment celui de modifier leurs propriétés de liaison aux formes mutées oncogéniques de p53, ou d'augmenter leur efficacité thérapeutique ou de réduire leurs effets secondaires, ou celui de leur conférer de nouvelles propriétés pharmacocinétiques et/ou biologiques.

A cet égard, un autre objet de l'invention concerne les séquences polypeptidiques qui présentent des fonctions biologiques comparables à celles des polypeptides selon l'invention et notamment la capacité à interagir avec les formes mutées oncogéniques de p53 et qui présentent un degré d'identité d'au moins 80 % et de préférence au moins 90 % avec la séquence polypeptidique SEQ ID N° 16 ou la séquence polypeptidique SEQ ID N°22 ou la séquence polypeptidique SEQ ID N°33.

De préférence, les séquences polypeptidiques selon l'invention présentent au moins 95 % et de préférence encore au moins 97 % d'identité avec la séquence polypeptidique SEQ ID N° 16 ou la séquence polypeptidique SEQ ID N°22 ou la séquence polypeptidique SEQ ID N°33.

De manière plus particulièrement préférée, les séquences polypeptidiques selon l'invention présentent au moins 98 % d'identité et de préférence encore au moins 99 % d'identité avec la séquence polypeptidique SEQ ID N° 16 ou la séquence polypeptidique SEQ ID N°22 ou la séquence polypeptidique SEQ ID N°33.

Le terme séquence polypeptidique dérivée comprend également les fragments des séquences polypeptidiques indiquées ci-dessus. De tels fragments peuvent être générés de différentes façons. En particulier, ils peuvent être synthétisés par voie chimique, sur la base des séquences données dans la présente demande, en utilisant les synthétiseurs peptidiques connus de l'homme du métier. Ils peuvent également être synthétisés par voie génétique, par expression dans un hôte cellulaire d'une séquence nucléotidique codant pour le peptide recherché. Dans ce cas, la séquence

nucléotidique peut être préparée chimiquement en utilisant un synthétiseur d'oligonucléotides, sur la base de la séquence peptidique donnée dans la présente demande et du code génétique. La séquence nucléotidique peut également être préparée à partir des séquences données dans la présente demande, par coupures enzymatiques, ligature, clonage, etc, selon les techniques connues de l'homme du métier, ou par criblage de banques d'ADN avec des sondes élaborées à partir de ces séquences.

Un autre objet de la présente invention concerne les séquences nucléotidiques SEQ ID N°15, SEQ ID N°21 et SEQ ID N°32 codant respectivement pour les séquences polypeptidiques présentées dans les séquences SEQ ID N°16, ou SEQ ID N°22 ou SEQ ID N°33.

Selon un mode particulier de l'invention, les séquences nucléotidiques comprennent tout ou partie de la séquence SEQ ID N° 15 ou SEQ ID N° 21 ou de leurs dérivées.

Selon un autre mode de l'invention, les séquences nucléotidiques comprennent tout ou partie de la séquence nucléotidique SEQ ID N° 32 (cDNA correspondant au fragment C-term de fibuline-2 murine) ou de ses dérivées.

Selon encore un autre mode, les séquences nucléotidiques comprennent la séquence SEQ ID N°23(cDNA MBP1 murine , séquence partielle), ou la séquence SEQ ID N°30 (cDNA correspondant au fragment C-term de MBP1 humaine).

Selon un mode préféré, la séquence nucléotidique est représentée par la séquence SEQ ID N° 21 ou ses dérivées.

Au sens de la présente invention, le terme séquence nucléotidique dérivée désigne toute séquence différant de la séquence considérée en raison de la dégénérescence du code génétique, obtenue par une ou plusieurs modifications de

nature génétique et/ou chimique, ainsi que toute séquence hybridant avec ces séquences ou des fragments de celles-ci et codant pour un polypeptide selon l'invention. Par modification de nature génétique et/ou chimique, on peut entendre toute mutation, substitution, délétion, addition et/ou modification d'un ou plusieurs
5 résidus.

Le terme séquence nucléotidique dérivée comprend également les séquences homologues à la séquence considérée, issues d'autres sources cellulaires et notamment de cellules d'origine humaine, ou d'autres organismes.

A cet égard la présente invention concerne toute séquence nucléotidique qui
10 présente au moins 70 % d'identité et de préférence au moins 85 % d'identité avec la séquence nucléotidique SEQ ID N°21 ou la séquence nucléotidique SED ID N°15 ou la séquence nucléotidique SEQ ID N°32.

De préférence, la séquence nucléotidique selon l'invention présente au moins
15 90 % et de préférence encore au moins 93 % d'identité avec la séquence nucléotidique SEQ ID N°21 ou la séquence nucléotidique SED ID N°15 ou la séquence nucléotidique SEQ ID N°32.

De manière plus particulièrement préférée, les séquences selon l'invention présentent au moins 95 % et de préférence encore 97 %, voire 98 % ou même 99 % d'identité avec la séquence nucléotidique SEQ ID N°21 ou la séquence nucléotidique
20 SED ID N°15 ou la séquence nucléotidique SEQ ID N°32.

De telles séquences homologues peuvent être obtenues par des expériences d'hybridation. Les hybridations peuvent être réalisées à partir de banques d'acides nucléiques, en utilisant comme sonde, la séquence native ou un fragment de celle-ci, dans des conditions variables d'hybridation.

Un autre objet de l'invention concerne des séquences nucléotidiques capables de s'hybrider dans des conditions de stringence élevée avec les séquences nucléotidiques définies ci-avant.

5 A cet égard, le terme condition de stringence élevée signifie que l'hybridation se produit si les séquences nucléotidiques présentent au moins 95 % et préférentiellement au moins 97 % d'identité.

10 Comme indiqué ci-avant, de telles séquences peuvent être notamment utilisées comme sondes de détection avec du RNA ou du cDNA ou du DNA génomique pour isoler des séquences nucléotidiques codant pour des polypeptides selon l'invention. De telles sondes ont généralement au moins 15 bases. De préférence, ces sondes font au moins 30 bases et peuvent avoir plus de 50 bases. De manière préférée, ces sondes ont entre 30 et 50 bases.

15 Les séquences nucléotidiques selon l'invention peuvent être d'origine artificielle ou non. Il peut s'agir de séquences génomiques, d'ADNc, d'ARN, de séquences hybrides ou de séquences synthétiques ou semi-synthétiques. Ces séquences peuvent être obtenues par exemple par criblage de banques d'ADN (banque d'ADNc, banque d'ADN génomique) au moyen de sondes élaborées sur la base de séquences présentées ci-avant. De telles banques peuvent être préparées à partir de cellules de différentes origine par des techniques classiques de biologie
20 moléculaire connues de l'homme du métier. Les séquences nucléotidiques de l'invention peuvent également être préparées par synthèse chimique ou encore par des méthodes mixtes incluant la modification chimique ou enzymatique de séquences obtenues par criblage de banques. D'une manière générale les acides nucléiques de l'invention peuvent être préparés selon toute technique connue de
25 l'homme du métier.

Au sens de la présente invention la dénomination formes oncogéniques ou forme mutées oncogéniques de p53 désigne les mutants dominant-oncogéniques,

dont le produit est une protéine qui a perdu la capacité de se lier à l'ADN et qui participe activement à la transformation néoplasique. Les mutants de cette catégorie ont perdu leur capacité transactivatrice et sont plus stables que la protéine sauvage. Les représentants de cette catégorie de mutants de p53 sont notamment les formes
5 mutantes H175, G281, W248, et A143.

10 Un autre objet de la présente invention concerne un procédé de préparation des polypeptides selon l'invention selon lequel on cultive une cellule contenant une séquence nucléotidique selon l'invention, dans des conditions d'expression de ladite séquence et on récupère le polypeptide produit. Dans ce cas, la partie codant pour
15 ledit polypeptide est généralement placée sous le contrôle de signaux permettant son expression dans un hôte cellulaire. Le choix de ces signaux (promoteurs, terminateurs, séquence leader de sécrétion, etc.) peut varier en fonction de l'hôte cellulaire utilisé. Par ailleurs, les séquences nucléotidiques de l'invention peuvent faire partie d'un vecteur qui peut être à répllication autonome ou intégratif. Plus
20 particulièrement, des vecteurs à répllication autonome peuvent être préparés en utilisant des séquences à répllication autonome chez l'hôte choisi. S'agissant de vecteurs intégratifs, ceux-ci peuvent être préparés, par exemple, en utilisant des séquences homologues à certaines régions du génome de l'hôte, permettant, par recombinaison homologue, l'intégration du vecteur.

20 La présente invention a également pour objet des cellules hôtes transformées avec un acide nucléique comportant une séquence nucléotidique selon l'invention. Les hôtes cellulaires utilisables pour la production des peptides de l'invention par voie recombinante sont aussi bien des hôtes eucaryotes que procaryotes. Parmi les hôtes eucaryotes qui conviennent, on peut citer les cellules
25 animales, les levures, ou les champignons. En particulier, s'agissant de levures, on peut citer les levures du genre *Saccharomyces*, *Kluyveromyces*, *Pichia*, *Schwanniomyces*, ou *Hansenula*. S'agissant de cellules animales, on peut citer les cellules d'insectes (SF9 ou SF21), les cellules COS, CHO, C127, de neuroblastomes

humains etc. Parmi les champignons, on peut citer plus particulièrement *Aspergillus* ssp. ou *Trichoderma* ssp. Comme hôtes procaryotes, on préfère utiliser les bactéries suivantes *E.coli*, *Bacillus*, ou *Streptomyces*.

5 Selon un mode préféré, les cellules hôtes sont avantageusement représentées par des souches de levures recombinantes pour l'expression des acides nucléiques de l'invention ainsi que la production des protéines dérivées de ceux-ci.

10 Préférentiellement, les cellules hôtes comprennent au moins une séquence ou un fragment de séquence choisis parmi les séquences nucléotidiques SEQ ID N°15, N°21, N°32, N°23 et N° 30 pour la production des polypeptides selon l'invention.

15 Une autre application des séquences d'acides nucléiques selon l'invention est la réalisation d'oligonucléotides antisens ou d'antisens génétiques utilisables comme agents pharmaceutiques. Les séquences antisens sont des oligonucléotides de petite taille, complémentaires du brin codant d'un gène donné, et de ce fait capables d'hybrider spécifiquement avec l'ARNm transcrit, inhibant la traduction en protéine. L'invention a ainsi pour objet les séquences antisens capables d'inhiber, au moins partiellement, l'expression de polypeptides capables d'interagir avec la p53 comme la protéine MBP1 ou la fibuline2. De telles séquences peuvent être constituées par tout ou partie des séquences nucléotidiques définies ci-avant et peuvent être obtenus
20 par fragmentation, etc. ou par synthèse chimique.

Les séquences nucléotidiques selon l'invention peuvent être utilisées pour le transfert et la production *in vitro*, *in vivo* ou *ex vivo* de séquences antisens ou pour l'expression de protéines ou de polypeptides capables d'interagir avec la protéine p53.

A cet égard les séquences nucléotidiques selon l'invention peuvent être incorporées dans des vecteurs viraux ou non viraux, permettant leur administration *in vitro*, *in vivo* ou *ex vivo*.

5 Un autre objet de l'invention concerne en outre tout vecteur comprenant une séquence nucléotidique définie ci-avant. Le vecteur de l'invention peut être par exemple un plasmide, un cosmide ou tout ADN non encapsidé par un virus, un phage, un chromosome artificiel, un virus recombinant etc. Il s'agit de préférence d'un plasmide ou d'un virus recombinant.

10 A titre de vecteurs viraux conformes à l'invention on peut tout particulièrement citer les vecteurs de type adénovirus, rétrovirus, virus adéno-associés, virus de l'herpès ou virus de la vaccine. La présente demande a également pour objet des virus recombinants défectifs comprenant une séquence nucléique hétérologue codant pour un polypeptide selon l'invention.

15 L'invention permet également la réalisation de sondes nucléotidiques, synthétiques ou non, capables de s'hybrider avec les séquences nucléotidiques définies ci-avant ou des ARNm correspondants. De telles sondes peuvent être utilisées *in vitro* comme outil de diagnostic, pour la détection des polypeptides selon l'invention et notamment de la protéine MBP1 humaine ou de la fibuline 2. Ces sondes peuvent également être utilisées pour la mise en évidence d'anomalies
20 génétiques (mauvais épissage, polymorphisme, mutations ponctuelles, etc). Ces sondes peuvent aussi être utilisées pour la mise en évidence et l'isolement de séquences d'acides nucléiques homologues codant pour les polypeptides tels que définis précédemment, à partir d'autres sources cellulaires et préférentiellement de cellules d'origines humaines. Les sondes de l'invention comportent généralement au
25 moins 10 nucléotides, de préférence au moins 15 nucléotides, et de préférence encore au moins 20 nucléotides. Préférentiellement, ces sondes sont marquées

préalablement à leur utilisation. Pour cela, différentes techniques connues de l'homme du métier peuvent être employées (marquage radioactif, enzymatique, etc).

L'invention concerne également l'utilisation de sondes nucléotidiques, synthétiques ou non, capables de s'hybrider avec les séquences nucléotidiques codant pour la protéine MBP1 pour la réalisation de test de diagnostic de tissus cancéreux basés sur la détection du niveau d'expression de MBP1. A titre d'exemple de sondes nucléotidiques utilisables pour cette application, on peut citer notamment les séquences SEQ ID N°27 et SEQ ID N°28. Ces sondes nucléotidiques permettent de détecter l'amplification de l'expression de la protéine MBP1. Ces sondes peuvent être des sondes ARN ou ADN. La présente invention met en évidence qu'une amplification de l'ARN messenger codant pour la protéine MBP1 humaine peut-être décelée dans certains types de tumeurs humaines et notamment dans le cas de cancers du colon. A cet égard, l'invention concerne également un procédé de diagnostic du cancer comportant le fait de détecter l'amplification de l'expression du gène codant pour la protéine MBP1 humaine.

Un autre objet de l'invention réside dans des anticorps ou fragments d'anticorps polyclonaux ou monoclonaux dirigés contre un polypeptide tel que défini ci-avant. De tels anticorps peuvent être générés par des méthodes connues de l'homme du métier. En particulier ces anticorps peuvent être préparés par immunisation d'un animal contre un polypeptide dont la séquence est choisie parmi les séquences SEQ ID N°9 (fragment C-terminal MBP1 murine) ou SEQ ID N°31 (fragment C-terminal MBP1 humaine) ou les séquences polypeptidiques SEQ ID N°22 (MBP1 humaine) ou SEQ ID N°33 (fragment C-term Fibuline-2) ou tout fragment ou dérivé de celles-ci, puis prélèvement du sang et isolement des anticorps. Ces anticorps peuvent également être générés par préparation d'hybridomes selon les techniques connues de l'homme de l'art.

L'invention a également pour objet des anticorps simple chaîne ScFv dérivés des anticorps monoclonaux définis ci-avant. De tel anticorps simple chaîne peuvent

être obtenus selon les techniques décrites dans les brevet US 4,946,778, US 5,132,405 et US 5,476,786.

Les anticorps ou fragments d'anticorps selon l'invention peuvent notamment être utilisés pour inhiber et/ ou révéler l'interaction entre la p53 et les polypeptides tels que définis ci-avant.

Un autre objet de la présente invention concerne un procédé d'identification de composés capables de se lier aux polypeptides selon l'invention. La mise en évidence et/ou l'isolement de ces composés, peut-être réalisée selon les étapes suivantes :

- on met en contact une molécule ou un mélange contenant différentes molécules, éventuellement non-identifiées, avec un polypeptide de l'invention dans des conditions permettant l'interaction entre ledit polypeptide et ladite molécule dans le cas où celle-ci posséderait une affinité pour ledit polypeptide, et,

- on détecte et/ou isole les molécules liées au dit polypeptide de l'invention.

Selon un mode particulier, un tel procédé permet d'identifier des molécules capables de s'opposer ou de bloquer l'activité de stimulation de la croissance cellulaire des polypeptides selon l'invention et notamment de la protéine MBP1 humaine ou Fibuline 2 ou des fragments dérivés de ces protéines. Ces molécules sont également susceptibles de présenter des propriétés anti-cancéreuses et de s'opposer à la fonction d'oncogènes immortalisants que présentent MBP1 ou les polypeptides dérivés de MBP1 qui coopèrent avec la forme activée de la protéine Ras pour la transformation cellulaire.

A cet égard, un autre objet de l'invention concerne l'utilisation d'un ligand identifié et/ou obtenu selon le procédé décrit ci-avant comme médicament. De tels

ligands sont en effet susceptibles de traiter certaines affections impliquant un dysfonctionnement du cycle cellulaire et notamment les cancers.

Un autre objet de la présente invention concerne un procédé d'identification de composés capables de moduler ou d'inhiber totalement ou partiellement l'interaction entre les formes mutées oncogènes de p53 et les polypeptides selon l'invention.

La mise en évidence et/ou l'isolement de modulateurs ou de ligands capables de moduler ou d'inhiber totalement ou partiellement l'interaction entre les formes mutées oncogènes de p53 et les polypeptides selon l'invention, peut-être réalisée selon les étapes suivantes :

- on réalise la liaison d'une forme mutée de p53 ou d'un fragment de celle-ci à un polypeptide selon l'invention ; il peut s'agir des formes mutées de p53 telles que H175, G281, W248, ou A143 ou d'un fragment de celles-ci, il s'agit préférentiellement de la forme H175 ou encore de la forme G281.

- on ajoute un composé à tester pour sa capacité à inhiber la liaison entre la forme mutée de p53 et les polypeptides selon l'invention ;

- on détermine si la forme mutée de p53 ou les polypeptides selon l'invention sont déplacés de la liaison ou empêchés de se lier ;

- on détecte et/ou isole les composés qui empêchent ou qui gênent la liaison entre la forme mutée de p53 et les polypeptides selon l'invention.

Dans un mode particulier, ce procédé de l'invention est adapté à la mise en évidence et/ou l'isolement d'agonistes et d'antagonistes de l'interaction entre les formes mutées de p53 et les polypeptides de l'invention. Toujours selon un mode particulier, l'invention fournit un procédé d'identification de molécules capables de

bloquer l'interaction entre les formes mutées de p53 et la protéine MBP1 humaine ou fibuline 2 humaine. Un tel procédé permet d'identifier des molécules capables de s'opposer aux effets de l'action des polypeptides selon l'invention avec les formes mutées de p53. En particulier de tels composés sont susceptibles de prévenir la

5 coopération oncogénique entre la protéine MBP1 et les formes mutantes oncogéniques de p53 telle notamment H175.

A cet égard, un autre objet de l'invention concerne l'utilisation d'un ligand ou d'un modulateur identifié et/ou obtenu selon le procédé décrit ci-avant comme médicament. De tels ligands ou modulateurs sont en effet susceptibles de traiter

10 certaines affections impliquant un dysfonctionnement du cycle cellulaire et notamment des cancers.

L'invention fournit également des composés non peptidiques ou non exclusivement peptidiques utilisables pharmaceutiquement. Il est en effet possible, à partir des motifs protéiques actifs décrits dans la présente demande, de réaliser des

15 molécules inhibitrices de l'interaction de MBP1 ou de la fibuline2 avec les formes mutées oncogéniques de p53, ces molécules étant non exclusivement peptidiques et compatibles avec une utilisation pharmaceutique. A cet égard, l'invention concerne l'utilisation d'un polypeptide de l'invention tel que décrit ci-avant pour la préparation

20 de molécules non-peptidiques, ou non exclusivement peptidiques, actives pharmacologiquement, par détermination des éléments structuraux de ce polypeptide qui sont importants pour son activité et reproduction de ces éléments par des structures non-peptidiques ou non exclusivement peptidiques. L'invention a aussi pour objet des compositions pharmaceutiques comprenant une ou plusieurs molécules ainsi préparées.

25 L'invention a encore pour objet toute composition pharmaceutique comprenant comme principe actif au moins un ligand obtenu selon l'un et/ou l'autre des procédés décrit ci-avant, et/ou au moins un anticorps ou fragment d'anticorps,

et/ou un oligonucléotide antisens, et/ou un composé non exclusivement peptidiques tels que décrits ci-avant.

Les compositions selon l'invention peuvent être utilisées pour moduler l'interaction des formes mutées oncogènes de p53 avec les polypeptides MBP1 ou Fibuline 2 et de ce fait peuvent être utilisées pour moduler la prolifération de certain type cellulaires. Plus particulièrement ces compositions pharmaceutiques sont destinées au traitement des maladies impliquant un dysfonctionnement du cycle cellulaire et notamment au traitement des cancers. Il s'agit en particulier des cancers associés à la présence de mutants oncogéniques de p53.

D'autres avantages de la présente invention apparaîtront à la lecture des exemples qui suivent et qui doivent être considérés comme illustratifs et non limitatifs.

Légende des Figures

Figure 1 : Domaines fonctionnels de la protéine p53 sauvage. TA : Domaine activateur de la transcription; DNB : domaine de liaison à l'ADN; NLS : signal de localisation nucléaire; OL : domaine d'oligomérisation; REG : domaine de régulation.

Figure 2 : Interaction entre la protéine C-mbp1 et les protéines p53 et H175 en cellules mammifères.

Figure 3 : Interaction entre la protéine C-fibulin2 et les protéines p53 et H175 en cellules mammifères.

Figure 4 : Comparaison des séquences protéiques codées par les ADNc mMBP1 (murine) et hMBP1 (humaine).

Figure 5 : Effets comparés des protéines C-mbp1 et MBP1 murine sur la croissance

cellulaire de cellules tumorales.

Figure 6 : Expression de l'ARNm codant pour la protéine MBP1 chez la souris.

- 5 Figure 7 : Expression de l'ARNm codant pour la protéine MBP1 dans différents tissus humains.

Figure 8 : Expression de l'ARN messager codant pour la protéine MBP1 humaine dans des tumeurs du colon.

10

Exemple 1 - Construction des différents fragments nucléotidiques nécessaires au criblage

1-a - Construction du cDNA codant pour la p53 sauvage humaine

15

Le gène de la p53 humaine a été cloné par réaction d'amplification en chaîne (PCR) sur de l'ADN d'une banque de placenta humain (Clontech) en utilisant les oligonucléotides 5'-1 et 3'-393.

Oligonucléotide 5'-1 (SEQ ID N° 1) :

AGATCTGTATGGAGGAGCCGCAG

20

Oligonucléotide 3'-393 (SEQ ID N° 2) :

AGATCTCATCAGTCTGAGTCAGGCCCTTC

Ce produit a ensuite été cloné directement après PCR dans le vecteur pCRII (Invitrogène).

25

1-b - Construction des cDNA codant pour les différentes formes mutées de la p53 humaine

1-b.(i) - Construction du cDNA codant pour le mutant H175 de la p53 humaine

5 Le cDNA portant une mutation ponctuelle sur l'acide aminé 175 de la protéine p53 humaine (Arginine -> Histidine) a été obtenu par mutagenèse dirigée sur l'ADN de p53 (décrit dans l'exemple 1-a) au moyen du kit Amersham, en utilisant l'oligonucléotide H175 de séquence :

Oligonucléotide H175 3' (SEQ ID N° 3) :

GGGGCAGTGCCTCAC

10 Ce fragment a été désigné H175.

1-b. (ii) - Construction du cDNA codant pour le mutant W248 de la p53 humaine

15 Le cDNA portant une mutation ponctuelle sur l'acide aminé 248 de la protéine p53 humaine (Arginine -> Tryptophane) a été obtenu par mutagenèse dirigée sur l'ADN de p53 (décrit dans l'exemple 1-a) au moyen du kit Amersham, en utilisant l'oligonucléotide W248 de séquence :

Oligonucléotide W248 3' (SEQ ID N° 4) :

GGGCCTCCAGTTCAT

20 Ce fragment a été désigné W248.

1-b (iii) - Construction du cDNA codant pour le mutant H273 de la p53 humaine

25 Le cDNA portant une mutation ponctuelle sur l'acide aminé 273 de la protéine p53 humaine (Aspartate -> Histidine) a été obtenu par mutagenèse dirigée sur l'ADN de p53 (décrit dans l'exemple 1-a) au moyen du kit Amersham, en utilisant l'oligonucléotide H273 de séquence :

Oligonucléotide H273 3' (SEQ ID N° 5) :

ACAAACATGCACCTC

Ce fragment a été désigné H273.

5 1-b (iv) - Construction du cDNA codant pour le mutant G281 de la p53 humaine

Le cDNA portant une mutation ponctuelle sur l'acide aminé 281 de la protéine p53 humaine (Asparagine -> Glycine) a été obtenu par mutagenèse dirigée sur l'ADN de p53 (décrit dans l'exemple 1-a) au moyen du kit Amersham, en utilisant
10 l'oligonucléotide G281 de séquence :

Oligonucléotide G281 3' (SEQ ID N° 6) :

GCGCCGGCCTCTCCC

Ce fragment a été désigné G281.

15 1-c - Construction des cDNA codant pour les fragments 73-393 de la p53 humaine sauvage et du mutant H175

1-c (i) - Construction du cDNA codant pour le fragment 73-393 de la p53 humaine sauvage

20 Cet exemple décrit la construction d'un cDNA codant pour les acides aminés 73 à 393 de la protéine p53 humaine sauvage (73-393wt).

Ce cDNA a été obtenu par réaction d'amplification en chaîne (PCR) sur l'ADN de p53 (décrit dans l'exemple 1-a) avec l'oligonucléotide 3'-393 (SEQ ID N° 2) et l'oligonucléotide 5'-73 suivant :

5'-73 (SEQ ID N° 7) :

25 AGATCTGTGTGGCCCCTGCACCA

1-c (ii) - Construction du cDNA codant pour le fragment 73-393 du mutant H175

Cet exemple décrit la construction d'un cDNA codant pour les acides aminés 73 à 393 du mutant H175 de la protéine p53 humaine (73-393H175).

Ce cDNA a été obtenu par réaction d'amplification en chaîne (PCR) sur l'ADN du mutant (décrit dans l'exemple 1-b) avec les oligonucléotides 3'-393 (SEQ ID N° 2) et 5'-73 (SEQ ID N° 7).

Exemple 2 - Construction des vecteurs d'expression dans la levure des fragments 73-393wt et 73-393H175 fusionnés au domaine de liaison à l'ADN de la protéine Gal4 et des différentes formes de la p53 humaine entière (sauvage et mutée) fusionnées au domaine d'activation de la transcription de la protéine Gal4

Cet exemple décrit la construction de vecteurs permettant l'expression dans la levure des fragments 73-393wt et 73-393H175 sous forme d'une fusion avec le domaine de liaison à l'ADN de la protéine Gal4 (DB) de la levure *S. cerevisiae* pour leur utilisation dans le système double-hybride et pour le criblage de banques de cDNA fusionnés au domaine d'activation de la transcription (transactivateur) de la même protéine Gal4 (TA).

2-a - Construction des vecteurs d'expression de levure des fragments 73-393wt et 73-393H175 fusionnés au domaine de liaison à l'ADN de la protéine Gal4

Les fragments 73-393wt et 73-393H175 ont été clonés dans le vecteur pPC97 (Chevray et al, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89 (1992) 5789) en utilisant le site de reconnaissance par l'enzyme de restriction Bgl II.

Les produits de ces constructions portent les noms suivants:

73-393wt dans pPC97 --> (plasmide pMA1) --> DB-wt
 73-393H175 dans pPC97 --> (plasmide pEC16)--> DB-H175

2-b - Construction des vecteurs d'expression de levure des différentes formes de la p53 humaine entière (sauvage et mutée) fusionnées au domaine d'activation

5 de la transcription de la protéine Gal4

Les différentes formes de la p53 humaine entière (sauvage et mutée) ont été clonées dans le vecteur pPC86 (Chevray et al, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89 (1992) 5789) en utilisant le site de reconnaissance par l'enzyme de restriction Bgl II.

Les produits de ces constructions portent les noms suivants:

10 p53 dans pPC86 --> (plasmide pEC10)--> TA-wt
 H175 dans pPC86 --> (plasmide pEC20)--> TA-H175
 H273 dans pPC86 --> (plasmide pEC87)--> TA-H273
 G281 dans pPC86 --> (plasmide pEC88)--> TA-G281

15 Exemple 3 - Clonage par le système double-hybride des partenaires de la protéine H175, et caractérisation de cette interaction en terme de spécificité dans la levure

Cet exemple décrit l'obtention des partenaires de la protéine H175 par le système double-hybride en utilisant la banque de cDNA d'embryon de souris pPC67 (Chevray et al, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89 (1992) 5789), et la caractérisation, à
 20 l'aide du même système double-hybride, de ces partenaires en terme de spécificité d'interaction avec les différentes formes de la protéine p53 humaine (sauvage et mutée).

3-a - Isolement des partenaires de la protéine H175

3-a (i) - Génotype de la souche YCM17

La souche YCM17 utilisée pour l'isolement des partenaires et pour la caractérisation de leur interaction avec les différentes formes de la protéine p53 humaine par le système double-hybride est une souche de levure du genre *Saccharomyces cerevisiae* qui possède le génotype suivant:

- 5 *MATa, Δgal4, Δgal80, lys2, his3, trp1, leu2, ade2, ura3, can1, met16::URA3 pGAL1-10 LacZ.*

Cette souche de levure permet de détecter une réponse positive en système double-hybride par l'apparition du phénotype Ura⁺ et/ou du double phénotype Ura⁺/LacZ⁺.

10 3-a (ii) - Génotype de la souche TG1

La souche TG1 utilisée pour la purification des ADN plasmidiques est une souche de bactérie du genre *E.coli* qui possède le génotype suivant:

supE, hsdD5, thi, D(lac-proAB), F'[tra D36 proA⁺B⁺ lacI^q lacZDM15]

3-a (iii) - Construction de la souche YMA1

- 15 La souche YCM17 a été transformée par la méthode de Gietz et al (Yeast 11 (1995) 355) avec 1μg du plasmide pMA1 permettant ainsi l'obtention de la souche YMA1 qui exprime la protéine DB-H175.

3-a (iv) - Isolement des partenaires de la protéine H175

- 20 La souche YMA1 a été transformée par la même méthode que celle utilisée dans l'exemple C1.3 en utilisant 100μg d'ADN de la banque pPC67, permettant l'obtention de 3,5.10⁷ transformants parmi lesquels 404 présentent le phénotype Ura⁺ et 14 le double phénotype Ura⁺/LacZ⁺.

L'ADN plasmidique contenu dans les 14 clones présentant le double phénotype Ura⁺/LacZ⁺ a été isolé par la méthode de Ward (Nucl. Acids Res. 18 (1990) 5319)

avant d'être utilisé pour transformer la souche TG1. Les plasmides correspondants issus de la banque ont ensuite été purifiés et regroupés en deux sous-groupes de plasmides différents contenant chacun un cDNA codant pour deux protéines différentes:

- 5 - un cDNA codant pour la partie C-terminale (SEQ ID N° 8) d'un nouveau gène.

 - un cDNA codant pour la partie C-terminale de la fibuline 2 murine (acides aminés 863 à 1195 (SEQ ID N° 32)) (Pan et al, J. Cell. Biol. 123 (1993) 1269).

- 10 Les protéines codées par ces deux cDNA sont appelées respectivement C-mbp1 (mbp = 'p53 Mutant Binding Protein') et C-fibuline2, les protéines de fusion avec le domaine d'activation de la transcription de Gal4 sont nommées TA-C-mbp1 et TA-C-fibuline2 et les plasmides correspondants sont nommés TA -C-MBP1 et TA-C-FIB2

3 - b - Caractérisation de l'interaction entre les protéines C-mbp1 et C-fibuline2 et la protéine H175 dans la levure

- 15 3 - b (i) - Caractérisation de la spécificité de l'interaction entre la protéine DB-H175 et les protéines TA-C-mbp1 et TA-C-fibuline2

- 20 Dans le but de tester la spécificité des interactions décrites dans l'exemple 3-a (iv), les plasmides pPC86, TA-C-MBP1 et TA-C-FIB2 ont été réintroduits dans la souche YCM17 par co-transformation avec différents plasmides : le plasmide pPC97 codant pour la protéine DB, le plasmide pMA1 codant pour la protéine DB-H175, le plasmide pEC10 codant pour la protéine DB-wt et le plasmide pPC76 codant pour une protéine de fusion entre le domaine de liaison à l'ADN de la protéine Gal4 et un fragment de la protéine Fos humaine (acides aminés 132 à 211) (Chevray et al, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89 (1992) 5789) (DB-Fos). Après la co-transformation, les
- 25 différents clones obtenus ont été testés pour les phénotypes associés aux gènes *URA3* et *LacZ*

Les résultats de cette expérience sont présentés dans le Tableau 1.

	TA	TA-C-mbp1	TA-C-fibuline2
DB	Ura - / LacZ-	Ura - / LacZ-	Ura - / LacZ-
DB-H175	Ura - / LacZ-	Ura + / LacZ+	Ura + / LacZ+
DB-wt	Ura - / LacZ-	Ura - / LacZ-	Ura - / LacZ-
DB-Fos	Ura - / LacZ-	Ura - / LacZ-	Ura - / LacZ-

Tableau 1: Spécificité de l'interaction entre la protéine DB-H175 et les protéines TA-C-mbp1 et TA-C-fibuline2

5

Ces résultats montrent que l'interaction entre la protéine DB-H175 et les protéines TA-C-mbp1 et TA-C-fibuline2 est spécifique et qu'une telle interaction ne peut être obtenue ni avec la protéine DB seule, ni avec la protéine DB-wt ni avec la protéine contrôle DB-Fos.

10

3-b (ii) - Construction de protéines de fusion entre le domaine liaison à l'ADN de Gal4 et les protéines C-mbp1 et C-fibuline2

15 Les cDNA codant pour C-mbp1 et C-fibuline2 ont été extraits des plasmides TA-C-MBP1 et TA-C-FIB2, puis clonés dans le vecteur pPC97 en utilisant les sites de reconnaissance par les enzymes de restriction Sal I et Not I.

Les protéines de fusion avec le domaine de liaison à l'ADN de Gal4 ainsi obtenues sont appelées respectivement DB-C-mbp1 et DB-C-fibuline2 et les plasmides correspondants DB-C-MBP1 et DB-C-FIB2.

3-b (iii) Caractérisation de la spécificité de l'interaction entre les DB-C-mbp1 et DB-C-fibuline2 et les protéines TA-H175 et TA-G281

Dans le but de vérifier que l'interaction potentielle entre les protéines C-mbp1 et C-fibuline2 et la protéine H175 n'est pas un artefact dû à la fusion de l'un ou l'autre des partenaires avec l'un ou l'autre des domaines de Gal4, et de confirmer la spécificité de l'interaction avec la forme mutante de la protéine p53, une nouvelle expérience d'interaction dans la levure a été effectuée en utilisant des fusions différentes de celles de l'exemple 3-b (i).

Dans cette expérience, les protéines DB-C-mbp1 et DB-C-fibuline2 ont été testées contre les fusions du domaine d'activation de la transcription de Gal4 avec les formes entières de la protéine p53 (sauvage ou mutante) décrites dans l'exemple 2-b, en utilisant une souche de levure différente de la souche YCM17, la souche PCY2 (Chevray et al, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89 (1992) 5789).

Les résultats de cette expérience sont présentés dans le Tableau 2.

	TA	TA-wt	TA-H175	TA-H273	TA-G281
DB	LacZ -	LacZ -	LacZ -	LacZ -	LacZ -
DB-C-mbp1	LacZ -	LacZ -	LacZ +	LacZ -	LacZ +
DB-C-fibuline2	LacZ -	LacZ -	LacZ +	LacZ -	LacZ +

Tableau 2: Spécificité de l'interaction entre les protéines DB-C-mbp1 et DB-C-fibuline2 et les protéines TA-H175 et TA-G281

Ces résultats permettent d'une part de confirmer l'interaction observée lors du criblage. D'autre part, ces résultats mettent en évidence, la spécificité de l'interaction entre les protéines C-mbp1 et C-fibuline2 et certaines formes mutées de la protéine p53. En ce qui concerne cette spécificité, il est intéressant de noter, que ces protéines

n'interagissent pas avec le mutant H273. En effet, ce mutant présente une conformation équivalente à celle de la protéine p53 sauvage car il est reconnu par l'anticorps PAb 1620 qui est spécifique de la forme sauvage et pas par l'anticorps PAb 240 qui est spécifique de la forme mutée (Medcalf et al, Oncogene 7 (1992) 71).

- 5 Ainsi, l'ensemble des données obtenues dans la levures montrent clairement que les deux protéines C-mbp1 et C-fibuline2 sont des partenaires potentiels spécifiques des mutants oncogéniques de la protéine p53.

10 **Exemple 4 - Interaction entre les protéines C-mbp1, C-fibuline2 et les différentes formes de la protéine p53 en cellules mammifères**

- Cet exemple décrit la construction de plasmides pour l'expression des différentes protéines en cellules mammifères et la caractérisation de l'interaction entre les protéines C-mbp1 et C-fibuline2 et les différentes formes de la protéine p53 en
15 cellules mammifères.

4-a Construction des plasmides d'expression des différentes protéines en cellules mammifères

- 20 4-a (i) Construction du vecteur d'expression pBFA 107

Cet exemple décrit la construction d'un vecteur permettant l'expression dans des cellules mammifères de protéines portant une étiquette dérivée de la protéine c-myc (acides aminés 410-419) et reconnue par l'anticorps 9E10 (Oncogene Science).

- 25 Cette construction a été effectuée en utilisant comme vecteur de base le vecteur d'expression mammifère pSV2, décrit dans DNA Cloning, A practical approach Vol.2, D.M. Glover (Ed) IRL Press, Oxford, Washington DC, 1985.

- 30 Le cDNA comprenant la séquence codant pour l'étiquette c-myc ainsi qu'un multisite de clonage (MCS) a été construit à partir des 4 oligonucléotides suivants :

c-myc 5' (SEQ ID N°10):

GATCCATGGAGCAGAAGCTGATCTCCGAGGAGGACCTGA

c-myc 3' (SEQ ID N°11):

GATCTCAGGTCCTCCTCGGAGATCAGCTTCTGCTCCATG

5 MCS 5' (SEQ ID N°12):

GATCTCGGTCGACCTGCATGCAATTCCCGGGTGCGGCCGCGAGCT

MCS 3' (SEQ ID N°13):

CGCGGCCGCACCCGGGAATTGCATGCAGGTCGACCGA

10 Ces quatre oligonucléotides présentent des complémentarités deux à deux (c-myc 5' / c-myc 3', MCS 5' / MCS 3') et des complémentarités chevauchantes (c-myc 3' / MCS 5') permettant l'obtention de la séquence nucléotidique désirée par simple hybridation et ligation. Ces oligonucléotides ont été phosphorylés à l'aide de la T4 kinase, puis hybridés tous ensemble et insérés dans le vecteur d'expression pSV2 préalablement digéré par les enzymes de restriction Bgl II et Sac I. Le vecteur
15 résultant est le vecteur pBFA 107.

4-a (ii) - Construction des plasmides d'expression des protéines C-mbp1 et C-fibuline2 étiquetées

20 Les cDNA codant pour les protéines C-mbp1 et C-fibuline2 ont été extraits des plasmides TA-C-MBP1 et TA-C-FIB2 et clonés dans le vecteur d'expression mammifère pBFA 107 en utilisant les sites de reconnaissance par les enzymes de restriction Sal I et Not I. On obtient ainsi les plasmides pBFA107-C-MBP1 et pBFA107-C-FIB2

25

4-a (iii) Construction des plasmides d'expression des différentes formes de la protéine p53

Les cDNA codant pour les différentes formes de la protéine p53 (wt, H175, H273 et G281) ont été insérés dans les vecteurs d'expression pSV2 et pcDNA3 (Invitrogen) en utilisant le site de reconnaissance par l'enzyme de restriction Bgl II.

5 4 b - Interaction entre les protéines C-mbp1 et C-fibuline2 et les différentes formes de la protéine p53 en cellules mammifères

Cet exemple décrit la mise en évidence dans des cellules mammifères de l'interaction entre les protéines C-mbp1 et C-fibuline2 et les différentes formes de la protéine p53. Ces expériences ont été effectuées par transfection transitoire et co-immunoprécipitation dans les cellules H1299 (cellules tumorales de type 'Non Small Cell Lung Cancer') déficientes pour les deux allèles de la protéine p53 (Mitsudomi et al, Oncogene 1 (1992) 171).

Les cellules (10^6) sontensemencées dans des boîtes de Pétri de 10 cm de diamètre contenant 8 ml de milieu DMEM (Gibco BRL) additionné de 10% de sérum de veau foetal inactivé à la chaleur, et cultivées sur la nuit dans un incubateur à CO₂ (5%) à 37°C. Les différentes constructions sont alors transfectées en utilisant la lipofectAMINE (Gibco BRL) comme agent de transfection de la façon suivante: 6 µg de plasmide total (3 µg de chaque plasmide codant pour chacun des deux partenaires) sont incubés avec 20 µl de lipofectAMINE (Gibco BRL) pendant 30 min avec 3 ml de milieu Opti-MEM (Gibco BRL) (mélange de transfection). Pendant ce temps, les cellules sont rincées deux fois au PBS puis incubées 4 h à 37°C avec le mélange de transfection, après quoi celui-ci est aspiré et remplacé par 8 ml de milieu DMEM additionné de 10% de sérum de veau foetal inactivé à la chaleur et les cellules remises à pousser à 37°C.

25 Vingt quatre heures après la transfection, les cellules sont lavées une fois en PBS puis grattées, lavées de nouveau deux fois en PBS et remises en suspension dans 200µl de tampon de lyse (HNTG: Hepes 50 mM pH 7,5, NaCl 150 mM, Triton X-100 1%, glycérol 10%) additionné d'inhibiteurs de protéases (Aprotinine 2 µg/ml,

pepstatine 1 µg/ml, leupeptine 1 µg/ml, E64 2 µg/ml et Pefabloc 1 mM), incubées 30 min à 4°C et centrifugées 15 min à 15.000 rpm et 4°C. L'extrait cellulaire ainsi obtenu est soumis à une étape de 'pré-clearing' par incubation 1h à 4°C avec 16µl d'un sérum de lapin pré-immun, puis 30 min à 4°C avec 200µl d'immunoprecipitin

- 5 (Gibco BRL) préparée selon les recommandations du fournisseur. Par la suite, l'extrait cellulaire ainsi nettoyé est séparé en 3 lots égaux dont chacun est incubé la nuit à 4°C avec un anticorps différent; 3 µg d'anticorps 9E10 (anti myc), 1 µg d'anticorps DO1 (anti p53) (Oncogene Science) et 1 µg d'anticorps PAb416 (anti SV40 T-Ag utilisé comme anticorps contrôle) (Oncogene Science). Ce mélange
- 10 [extrait cellulaire/anticorps] est ensuite additionné de 30µl d'immunoprecipitin et incubé 30 min à 4°C avant d'être centrifugé 30 sec à 15.000 rpm. Le culot contenant l'immunoprecipitin est ensuite lavé deux fois par 1 ml de tampon HNTG additionné d'inhibiteurs de protéases, puis resuspendu dans 30 µl de tampon de dépôt sur gel d'acrylamide (Laemmli, Nature 227 (1970) 680) et incubé 5 min à 95°C. Après
- 15 centrifugation 15 sec à 15.000 rpm, les surnageants sont déposés sur gel de polyacrylamide en milieu dénaturant (Novex) et les protéines séparées en utilisant le système de migration XCell II (Novex) suivant les recommandations du fournisseur, puis transférées sur membrane de PVDF (NEN Life Science Products) à l'aide du même système XCell II.

- 20 Les anticorps 9E10 et DO1 utilisés pour la révélation des protéines transférées sont couplés à la biotine LCnHS (Pierce) suivant les recommandations du fournisseur.

- 25 Les membranes de transfert sont tout d'abord incubées 1 h à 4°C dans 10 ml de tampon TTBSN (Tris-HCl 20 mM, pH 7,5, NaCl 150 mM, NaN₃ 0,02%, Tween 20 0,1%) additionné de 3% d'albumine bovine sérique (BSA) (TTBSN-BSA), puis 2 h à température ambiante avec 10 ml d'une solution de TTBSN-BSA contenant l'anticorps 9E10 biotinylé (1 µg/ml). Après 6 lavages par 10 ml de tampon TTBSN, les membranes sont ensuite incubées 1 h à température ambiante avec 10 ml d'une solution de TTBSN-BSA contenant de l'ExtrAvidin-Peroxidase (Sigma Immuno

Chemicals) au 1/5000^e, lavées de nouveau 6 fois au TTBSN et traitées au réactif ECL (Amersham) pour la révélation des protéines par chemiluminescence. Les mêmes membranes sont ensuite traitées par l'anticorps DO1 biotinylé après avoir été préalablement deshybridées (Ellis et al, Nature 343 (1990) 377) et en suivant le

5 même protocole que pour l'anticorps 9E10.

4 - b (i) - Interaction entre la protéine C-mbp1 et les différentes formes de la protéine p53 en cellules mammifères

10 Dans cet exemple, les cellules H1299 ont été transfectées avec les combinaisons de plasmides suivantes avant immunoprécipitation et Western-blot :

pBFA107 / pBFA107-C-MBP1 (3 µg) + pSV2 / pSV2-p53 (sauvage ou mutant)
(3 µg)

15 De plus la combinaison suivante servant de contrôle a été effectuée :
pBFA107-Sam68 (3 µg) + pSV2-H175 (3 µg)

20 Ce contrôle sert à examiner si H175 peut ou non interagir soit avec l'étiquette myc soit avec une fusion entre l'étiquette myc et une protéine quelconque, la protéine Sam68 décrite par Lock et al (Cell 84(1996)23), n'étant pas censée interagir avec les différentes formes de la protéine p53.

Les résultats de cette expérience qui sont présentés dans la Figure 2 montrent que :

25 - la protéine C-mbp1 peut interagir avec la protéine H175 dans des cellules mammifères

- cette interaction est bien spécifique de la protéine C-mbp1 car la protéine H175 n'intragit pas avec le contrôle myc-Sam68

4-b (ii) - Interaction entre la protéine C-fibuline2 et les différentes formes de la protéine p53 en cellules mammifères

Dans cet exemple, les cellules H1299 ont été transfectées avec les
5 combinaisons de plasmides suivantes avant immunoprécipitation et Western-blot :

pBFA107 / pBFA107-C-FIB2 (3 µg) + pSV2 / pSV2-p53 (sauvage ou mutant) (3 µg)

Les résultats de cette expérience qui sont présentés dans la Figure 3 montrent
10 que la protéine C-fibuline2 peut interagir spécifiquement avec la protéine H175 dans des cellules mammifères.

La conclusion générale de ces expériences est que les protéines C-mbp1 et C-fibuline2 sont capables d'interagir spécifiquement en cellules mammifères avec la
15 protéines H175. Ces résultats de même que ceux obtenus dans la levure (exemple 3) sont en accord avec :

1/ la classification des mutants de la protéine p53 :

- H175 et G281: dominants oncogéniques
- H273: mutant faible

20 2/ la classification des différentes formes de la protéine p53 en terme de conformation et de reconnaissance par des anticorps conformationnels :

- H175 et G281 : conformation mutante, PAb 1620 - / PAb 240 +
- p53 et H273 : conformation sauvage, PAb 1620 + / Pab 240 -

25 L'ensemble des ces données montrent que les protéines C-mbp1 et C-fibuline2 interagissent avec les formes de la protéine p53 présentant une conformation mutée, et qu'elles sont susceptibles d'avoir un effet sur des fonctions spécifiques des formes mutées de la protéine p53.

De plus, de par la littérature, on sait qu'une fraction de la protéine p53 peut
30 exhiber une conformation mutante dans les cellules mammifères, en particulier :

1/ la protéine p53, capable de se lier à l'ADN (Hupp et al, Nucl. Acids Res. 21 (1993) 3167), peut adopter une conformation mutante lorsqu'elle se lie à l'ADN (Halazonetis et al, EMBO J. 12 (1993) 1021)

2/ la protéine p53 peut adopter deux conformations différentes au cours du cycle cellulaire; la conformation dite 'suppresseur' (conformation sauvage, PAb 1620 + / PAb 240 -) et la conformation dite 'promoteur' (conformation mutante, PAb 1620 - / PAb 240 +) (Milner & Watson, Oncogene 2 (1990) 1683).

On peut donc supposer que les protéines C-mbp1 et C-fibuline 2 sont également susceptibles d'avoir un effet sur des fonctions spécifiques de la forme sauvage de la protéine p53.

Exemple 5 - Effet de la protéine C-mbp1 sur la coopération oncogénique entre la protéine H175 et la protéine Ras-Val12

Cet exemple décrit les effets de la protéine C-mbp1 sur une propriété du mutant oncogénique H175, sa capacité à coopérer avec la forme mutée du proto-oncogène Ras (Ras-Val12) dans la transformation oncogénique de fibroblastes embryonnaires de rat

Les fibroblastes embryonnaires de rat (REF) ont été préparés à partir de rats OFA (IFA-CREDO) selon la méthode décrite par C. Finlay (Methods in Enzymology 255 (1995) 389). Après décongélation, les cellules ($1,5 \cdot 10^6$) sontensemencées dans des boîtes de Pétri de 10 cm de diamètre contenant 8 ml de milieu DMEM (Gibco BRL) additionné de 10% de sérum de veau foetal et cultivées sur la nuit dans un incubateur à CO₂ (5%) à 37°C, puis sont transfectées par les différents mélanges de plasmides (21 µg d'ADN) en utilisant le réactif CellPfect (Pharmacia) suivant les recommandations du fournisseur. 24 h après la fin de la transfection, les cellules contenues dans chacune des boîtes sont grattées puis réensemencées sur trois boîtes de Pétri de 10 cm et cultivées pendant 15 jours avant d'être colorées au cristal violet suivant le protocole décrit par C. Finlay (Methods in Enzymology 255 (1995) 389).

Les foyers de transformation sont alors visualisés et comptés.

Les plasmides utilisés au cours de cette série d'expériences sont les suivants:

- plasmide tampon: pSG5 (Stratagene)
- 5 - plasmide d'expression de la protéine Ras-Val12: pEJ-Ras (Shih & Weinberg, Cell 29 (1982) 161)
- plasmide d'expression de la protéine c-myc entière: pSVc-myc1 (Land et al, Nature 304 (1983) 596)
- plasmide d'expression de la protéine H175: pSV2-H175 (exemple 4-a (iii))
- 10 - plasmide d'expression de la protéine C-mbp1: pBFA107-C-MBP1(exemple 4-a (ii))

Chaque point de transfection contient un mélange de trois plasmides à raison de 7 μ g de chaque plasmide. Les résultats de deux expériences indépendantes sont reportés dans le Tableau 3.

15

	Expérience 1	Expérience 2
contrôle	0	0
Ras-Val12	0	0
c-myc	0	NT
H175	0	NT
C-mbp1	0	NT
Ras-Val12 + c-myc	111	16 *
Ras-Val12 + c-myc + C-mbp1	113	12 *
Ras-Val12 + H175	0	16
Ras-Val12 + C-mbp1	0	3
Ras-Val12 + H175 + C-mbp1	13	30

Tableau 3. Effet de la protéine C-mbp1 sur la coopération oncogénique entre la protéine H175 et la protéine Ras-Val12 (NT: non testé , *: expérience effectuée avec 3 µg de plasmide pSVc-myc1)

5 Les résultats de ces expériences montrent que :

- C-mbp1 peut coopérer avec la forme activée de Ras pour la transformation des REF

- il existe une synergie entre les protéines H175 et C-mbp1 dans la coopération oncogénique avec Ras qui est spécifique de cette association car C-mbp1 ne présente aucun effet sur la coopération oncogénique Ras / c-myc.

10

Exemple 6 - Effet des protéines C-mbp1 et C-fibuline2 et relation avec les effets des différentes formes de la protéine p53 sur la croissance cellulaire des cellules tumorales

Cet exemple décrit les effets des protéines C-mbp1 et C-fibuline2 sur la croissance cellulaire des cellules tumorales et leur relation avec les effets des différentes formes de la protéine p53 sur cette même croissance cellulaire.

- 5 Ces effets des protéines C-mbp1 et C-fibuline2 sur la croissance cellulaire ont été testés sur la lignée cellulaire H1299 dans une expérience de formation de colonies résistantes à la néomycine suite à la transfection par des plasmides exprimant ces protéines.

Ces expériences de transfection ont été effectuées selon le protocole décrit dans l'exemple 4-b en utilisant 10^5 cellules par point et 1,5 μ g d'ADN total.

- 10 Les plasmides utilisés au cours de cette série d'expériences sont les suivants:
- plasmides d'expression des protéines p53 et H175: pSV2-p53 et pSV2-H175.
 - plasmide d'expression de la protéine C-mbp1: pBFA107-C-MBP1(exemple 4-a (ii))
 - plasmide d'expression de la protéine C-fibuline2: pBFA107-C-FIB2 (exemple 4-a (ii))
- 15 - plasmide conférant la résistance à la néomycine: pSV2-Neo pour une quantité totale de 0,4 μ g

- 20 Protocole de formation de colonies résistantes à la néomycine : 48h après transfection, les cellules sont grattées et transférées dans 2 boîtes de Pétri de 10 cm de diamètre et remises en culture avec 10 ml de milieu DMEM additionné de 10% de sérum de veau foetal inactivé à la chaleur et contenant 400 μ g/ml de généticine (G418). Après une sélection de 15 jours en présence de G418, le nombre de colonies Neo^R est déterminé par comptage après coloration à la fuchsine.

- 25 Les résultats de ces expériences sont reportés dans les Tableaux 4 et 5.

Nombre de colonies résistantes à la Néomycine				
Protéine exprimée	Expérience 1	Expérience 2	Expérience 3	moyenne
Vecteur	36 (1,00)	52 (1,00)	73 (1,00)	1,00
C-mbp1 100ng	45 (1,25)	49 (1,06)	69 (0,95)	1,09
C-mbp1 500ng	51 (1,42)	71 (1,37)	110(1,51)	1,43
C-mbp1 1000ng	70(1,94)	83 (1,60)	160 (2,19)	1,90
p53 sauvage 100ng	7 (0,19)	12 (0,23)	10 (0,14)	0,19
C-mbp1 100ng	6 (0,17)	14 (0,27)	8 (0,11)	0,18
C-mbp1 500ng	19 (0,53)	28 (0,54)	23 (0,32)	0,46
C-mbp1 1000ng	32 (0,89)	50 (0,96)	51 (0,70)	0,85
p53 sauvage 200ng	2 (0,06)	5 (0,10)	8 (0,11)	0,08
C-mbp1 100ng	2 (0,06)	4 (0,08)	6 (0,08)	0,08
C-mbp1 500ng	5 (0,14)	8 (0,15)	16 (0,22)	0,17
C-mbp1 1000ng	9 (0,25)	20 (0,38)	28 (0,38)	0,35
H175 100ng	41 (1,14)	47 (0,90)	61 (0,84)	0,96
C-mbp1 100ng	33 (0,92)	65 (1,25)	70 (0,96)	1,04
C-mbp1 500ng	67 (1,86)	101 (1,94)	123 (1,68)	1,83
C-mbp1 1000ng	162 (4,50)	128 (2,46)	316 (4,33)	3,76
H175 200ng	39 (1,08)	60 (1,15)	66 (1,10)	1,11
C-mbp1 100ng	43 (1,19)	54 (1,04)	75 (1,03)	1,10
C-mbp1 500ng	59 (1,64)	129 (2,48)	163 (2,23)	2,12
C-mbp1 1000ng	131 (3,64)	282 (5,42)	299 (4,10)	4,39

Tableau 4: Effet de la protéine C-mbp1 sur la croissance cellulaire de cellules

5 tumorales

Nombre de colonies résistantes à la Néomycine				
Protéine exprimée	Expérience 1	Expérience 2	Expérience 3	moyenne
Vecteur	36 (1,00)	52 (1,00)	73 (1,00)	1,00
C-fibuline2 100ng	35 (0,97)	56 (1,08)	80 (1,10)	1,05
C-fibuline2 500ng	48 (1,33)	68 (1,31)	102 (1,40)	1,35
C-fibuline2 1000ng	60 (1,67)	87 (1,67)	194 (2,66)	2,00
p53 sauvage 100ng	7 (0,19)	12 (0,23)	10 (0,14)	0,19
C-fibuline2 100ng	10 (0,28)	11 (0,21)	13 (0,18)	0,22
C-fibuline2 500ng	15 (0,42)	30 (0,58)	26 (0,36)	0,45
C-fibuline2 1000ng	35 (0,97)	44 (0,85)	45 (0,62)	0,81
p53 sauvage 200ng	2 (0,06)	5 (0,10)	8 (0,11)	0,09
C-fibuline2 100ng	3 (0,08)	6 (0,12)	6 (0,08)	0,09
C-fibuline2 500ng	4 (0,11)	10 (0,19)	16 (0,22)	0,16
C-fibuline2 1000ng	10 (0,28)	18 (0,35)	28 (0,38)	0,34
H175 100ng	41 (1,14)	47 (0,90)	61 (0,84)	0,96
C-fibuline2 100ng	47 (1,31)	54 (1,04)	84 (1,15)	1,17
C-fibuline2 500ng	84 (2,33)	95 (1,83)	156 (2,14)	2,10
C-fibuline2 1000ng	143 (3,97)	138 (2,65)	270 (3,70)	3,44
H175 200ng	39 (1,08)	60 (1,15)	66 (1,10)	1,11
C-fibuline2 100ng	51 (1,42)	63 (1,21)	80 (1,10)	1,24
C-fibuline2 500ng	74 (2,06)	146 (2,81)	142 (1,95)	2,27
C-fibuline2 1000ng	158 (4,39)	230 (4,42)	284 (3,89)	4,23

Tableau 5: Effet de la protéine C-fibuline2 sur la croissance cellulaire de cellules tumorales

Les résultats de ces expériences montrent que :

- 5 - les protéines C-mbpl et C-fibuline2 ont un effet positif sur la croissance cellulaire
- les protéines C-mbpl et C-fibuline2 sont capables de bloquer l'effet anti-prolifératif de la protéine p53, et ce indépendamment de leur effet prolifératif

- l'effet prolifératif des protéines C-mbp1 et C-fibuline2 est fortement augmenté en présence de la protéine H175

Exemple 7 - Clonage des ADNc codant pour la forme entière des protéines

5 MBP1 murine et humaine.

Cet exemple décrit le clonage des ADNc codant pour la protéine MBP1 murine entière et l'utilisation de ces données pour le clonage d'un homologue humain de MBP1.

10 7 a - Clonage de l'ADNc codant pour la forme entière de la protéine mbp1 murine

L'ADNc codant pour la partie C-terminale de la protéine mbp1 murine a été cloné par réaction d'amplification en chaîne (PCR) sur l'ADN de la banque SuperScript d'embryon murin (8,5 jours) (Gibco BRL) en utilisant l'oligonucléotide 3'-mMBP1 et l'oligonucléotide SP6 (Gibco BRL).

Oligonucléotide 3'-mMBP1 (SEQ ID N° 14) :
CGGTACTGGCAGAGGTAAGTGG

Cette amplification a permis d'obtenir un produit unique présentant une taille d'environ 800 paires de bases qui a ensuite été cloné directement après PCR dans le vecteur pCRII (Invitrogene) et séquencé. La séquence ainsi obtenue (SEQ ID N° 23) montre un recouvrement de 368 paires de bases avec C-MBP1 (SEQ ID N° 8) avec une identité stricte de séquence sur cette partie commune. De plus, en 5' de cette partie commune, on trouve une séquence additionnelle de 445 paires de bases présentant une phase de lecture ouverte et un codon d'initiation de la traduction.

25 Les deux fragments représentés par ces séquences ont ensuite été rassemblés par une ligation à trois partenaires en utilisant les sites de reconnaissance par les enzymes de restriction EcoR I, Pst I et Not I et le plasmide pBC-SK+

(STRATAGENE) permettant ainsi la reconstitution de l'ADNc MBP1 murin entier (mMBP1) (SEQ ID N° 15).

7-b Clonage de l'ADNc codant pour la forme entière de la protéine mbp1 humaine

La séquence du gène murin MBP1 a été utilisée pour une recherche d'homologie dans Genbank. Cette recherche a permis de montrer une forte homologie avec la séquence d'une EST humaine (g1548384). A partir de cette séquence, deux fragments d'ADNc ont été clonés par réaction d'amplification en chaîne (PCR) sur l'ADN de la banque SuperScript de testicule humain (Gibco BRL) en utilisant les oligonucléotides 3'-hMBP1 et SP6 (Gibco BRL) d'une part, et les oligonucléotides 5'-hMBP1 et T7 (Gibco BRL) d'autre part.

Oligonucléotide 3'-hMBP1 (SEQ ID N° 17) :

CTCCGCTCCGAGGTGATGGTC

Oligonucléotide 5'-hMBP1 (SEQ ID N° 18) :

TGTAGCTACTCCAGCTACCTC

Ces amplifications ont permis d'obtenir deux produits présentant des tailles d'environ 1100 et 700 paires de bases qui ont ensuite été clonés directement après PCR dans le vecteur pCRII (Invitrogene) et séquencés. Les séquences ainsi obtenues (SEQ ID N° 19 et SEQ ID N° 20) montrent un recouvrement de 325 paires avec une identité stricte de séquence sur cette partie commune.

Les deux fragments représentés par ces séquences ont ensuite été rassemblés par une ligation à trois partenaires en utilisant les sites de reconnaissance par les enzymes de restriction EcoR I, Nco I et Not I et le plasmide pBC-SK+ (STRATAGENE) permettant ainsi la reconstitution de l'ADNc MBP1 humain entier (hMBP1) (SEQ ID N° 21) présentant une phase de lecture ouverte et un codon d'initiation de la traduction.

La comparaison des séquences protéiques correspondant aux ADNc précédemment obtenus (Exemples 7-a et 7-b) (Figure 4) montre une identité stricte de 95% dans la phase ouverte de lecture supposée (après le site de démarrage de la traduction (ATG) supposé). Par contre, une absence d'identité et une très mauvaise

5 homologie sont observées entre les régions situées en amont de ce site de démarrage de la traduction (ATG) putatif. Ces données permettent donc de confirmer cette position comme démarrage de la traduction et par là même que ces deux ADNc codent bien pour les formes entières des protéines MBP1 humaine (SEQ ID N°22) et murine (SEQ ID N°16).

10

7 - c Construction des plasmides d'expression en cellules mammifères des formes murine et humaine de la protéine mbp1

Les ADNc codant pour les formes murine et humaine de la protéine MBP1 contenus dans le vecteur pBC SK+, ont été insérés dans les vecteurs d'expression

15 pSV2 et pcDNA3 (Invitrogen) en utilisant les sites de reconnaissance par les enzymes de restriction Hind III et Not I.

Exemple 8 - Effets comparés des protéines C-mbp1 et mbp1 murine sur la croissance cellulaire des cellules tumorales

20

Cet exemple décrit les effets comparés des protéines C-mbp1 et mbp1 murine sur la croissance cellulaire des cellules tumorales et leur relation avec les effets de la protéine H175 sur cette même croissance cellulaire.

25

Ces effets de la protéine mbp1 murine sur la croissance cellulaire ont été testés sur la lignée cellulaire H1299 dans une expérience de formation de colonies résistantes à la néomycine suite à la transfection par des plasmides portant les ADNc codant pour ces protéines.

Ces expériences de transfection ont été effectuées selon le protocole décrit dans l'exemple D2 en utilisant 10^5 cellules par point et 1,5 µg d'ADN total.

Les plasmides utilisés au cours de cette série d'expériences sont les suivants:

- plasmide d'expression de la protéine H175: pSV2-H175.
 - plasmide d'expression de la protéine C-mbp1: pBFA107-C-MBP1(exemple 4-a (ii))
 - plasmide d'expression de la protéine mbp1 murine: pSV2-mMBP1 (exemple 7-c)
- 5 - plasmide conférant la résistance à la néomycine: pSV2-Neo pour une quantité totale de 0,4 μ g

Le protocole de formation de colonies résistantes à la néomycine utilisé est celui décrit dans l'exemple 6. Les résultats de cette expérience sont présentés dans le Tableau 6 et la Figure 5.

10

Protéine exprimée	Nombre de colonies résistantes à la Néomycine	
	Expérience 1	Expérience 2
Vecteur	61 (1,00)	71 (1,00)
C-mbp1 100ng	67 (1,10)	
C-mbp1 500ng	96 (1,57)	
C-mbp1 1000ng	278 (4,56)	239 (3,37)
mbp1 100ng	94 (1,54)	
mbp1 500ng	128 (2,10)	
mbp1 1000ng	419 (6,87)	562 (7,92)
H175 200ng	65 (1,07)	69 (0,97)
C-mbp1 100ng	72 (1,18)	
C-mbp1 500ng	134 (2,20)	
C-mbp1 1000ng	397 (6,51)	341 (4,80)
mbp1 100ng	81 (1,33)	
mbp1 500ng	206 (3,38)	
mbp1 1000ng	729 (11,95)	1215 (17,11)

Tableau 6 : Effets comparés des protéines C-mbp1 et mbp1 murine sur la croissance cellulaire de cellules tumorales

5 Les résultats de cette expérience montrent que la protéine mbp1 murine présente les mêmes caractéristiques que la protéine C-mbp1, à savoir un effet positif sur la croissance cellulaire qui est fortement augmenté en présence de la protéine H175.

10 De plus cet effet de la protéine mbp1 est très fortement augmenté par rapport à la protéine tronquée C-mbp1.

Exemple 8 bis - Coopération oncogénique des protéines C-mbp1 et mbp1 murine et mbp1 humaine avec la protéine Ras-Val12

15 Cet exemple décrit les effets comparés des protéines C-mbp1, mbp1 murine et mbp1 humaine dans une expérience de coopération oncogénique avec la protéine Ras-Val12.

Cette coopération oncogénique a été testée sur des fibroblastes embryonnaires de rat suite à la transfection par des plasmides portant les ADNc codant pour ces protéines et suivant le protocole décrit dans l'exemple 5.

Les résultats de cette expérience sont présentés dans le Tableau 7.

	Expérience 1	Expérience 2
contrôle	0	0
Ras-Val12	0	0
c-myc	0	0
H175	0	0
C-mbp1	0	0
mbp1	0	0
Ras-Val12 + c-myc	31	42
Ras-Val12 + H175	10	15
Ras-Val12 + C-mbp1	4	4
Ras-Val12 + mbp1 murine	5	7
Ras-Val12 + mbp1 humaine	6	6

Tableau 7: Coopération oncogénique des protéines C-mbp1, mbp1 murine et mbp1 humaine avec la protéine Ras-Val12

- 5 Les résultats de cette expérience montrent que les protéine MBP1 murine et MBP1 humaine présentent les mêmes caractéristiques que la protéine C-mbp1, à savoir la capacité de coopérer avec la protéine Ras-Val12 pour la transformation de fibroblastes embryonnaires de rat.

- 10 De façon intéressante, on note aussi que les fibroblastes ainsi transformés présentent un aspect morphologique tout à fait particulier qui diffère de celui obtenu avec l' oncogène c-myc.

Exemple 9 - Expression de la protéine MBP1 chez la souris et dans les tissus humains

Cet exemple décrit l'étude de l'expression de l'ARN messager de MBP1 chez la souris et dans différents tissus humains.

5 9-a Préparation des sondes

Les sondes mMBP1 et hMBP1 sont constituées par les ADNc correspondants.

La sonde GAPDH (contrôle) a été générée par réaction d'amplification en chaîne (PCR) sur l'ADN de la banque SuperScript de testicule humain (Gibco BRL) (GAPDH) en utilisant les oligonucléotides suivants :

10 Oligonucléotide sens-GAPDH (SEQ ID N° 24) :

CGGAGTCAACGGATTTGGTCGTAT

Oligonucléotide antisens-GAPDH(SEQ ID N° 25) :

AGCCTTCTCCATGGTGGTGAAGAC

15 Les sondes ont été radiomarquées au ^{32}P -dCTP en utilisant le kit Rediprime (Amersham) et les recommandations du fournisseur, et les nucléotides non incorporés ont été éliminés par chromatographie sur des colonnes MicroSpin G-25 (Pharmacia Biotech). Les Northern blots utilisés lors de cette expérience ont été obtenus chez Clontech. Les membranes ont été préhybridées avec la solution ExpressHyb
20 (Clontech) 45 minutes à 65°C, puis incubées 2 heures avec les sondes radiomarquées à 65°C, lavées trois fois avec du tampon 2xSSC deux fois avec du tampon 2xSSC additionné de 0,1% de SDS et enfin lavées avec du tampon 0,2xSSC additionné de 0,1% de SDS jusqu'à disparition du bruit de fond. Les membranes ont ensuite été
25 soumises à autoradiographie et une quantification du signal a été effectuée à l'aide d'un instantimager (Packard instruments).

9-b Expression de la protéine MBP1 chez la souris

Cet exemple décrit l'étude de l'expression de l'ARN messenger de MBP1 chez la souris.

- Les sondes utilisées dans cette expérience sont les sondes mMBP1 et GAPDH
- 5 . Les membranes utilisées dans cette expérience contiennent l'une des ARNm d'embryon de souris obtenus à différents stades du développement, et l'autre des ARNm représentatifs de différents tissus de souris adulte.

Les résultats de cette expérience (Figure 6) indiquent clairement que:

- 10 1 - un transcript unique de 1,8 kb est détecté aussi bien dans les ARNm d'embryon de souris que dans les tissus de souris adulte.
- 2 - ce messenger présente des variations de niveaux d'expression au cours du développement, avec une forte abondance dans les stades précoces (7 jours) puis une diminution importante (11 jours) pour atteindre un niveau apparemment constant.
- 15 3 - ce messenger est modérément exprimé dans l'ensemble des tissus adultes testé à l'exception d'une expression importante dans le poumon et les testicules.

- Un tel niveau d'expression de transcript élevée dans une phase du développement embryonnaire ainsi que dans des tissus présentant un taux de
- 20 croissance élevé, confirme l'implication du produit du gène MBP1 dans les processus de croissance cellulaire mise en évidence dans les exemples 5, 6 et 7.

9-c Expression de la protéine MBP1 dans les tissus humains

- 25 Cet exemple décrit l'étude de l'expression de l'ARN messenger de MBP1 dans différents tissus humains.

Les sondes utilisées dans cette expérience sont les sondes hMBP1 et GAPDH

. Les membranes utilisées contiennent des ARNm représentatifs de différents tissus humain.

Les résultats de cette expérience (Figure 7) indiquent clairement que:

- 1 - deux transcripts de 1,5 et 1,8 kb sont détectés dans les tissus humains.
- 2 - ces messagers sont modérément exprimés dans l'ensemble des tissus testés et leur
- 5 profil d'expression est comparable à celui du messenger murin (forte expression dans le poumon et les testicules).

Ces résultats montrent que:

- il peut exister deux formes différentes de la protéine mbp1 humaine avec
- 10 possibilité d'épissage alternatif du messenger.
- les ARNm codant pour la(les) protéine(s) mbp1 humaine(s) tout comme leur
- homologue murin présentent un niveau d'expression élevé dans des tissus à taux de
- croissance élevé, et que le(s) produit(s) du gène MBP1 humain pourrait(ent) donc
- aussi être impliqué(s) dans les processus de croissance cellulaire.

15

Les résultats présentés dans les différents exemples montrent que les protéines C-mbp1, MBP1 et C-fibuline2 interagissent spécifiquement avec les formes mutantes de la protéine p53 et que ces interactions conduisent à une synergie entre ces protéines et les mutants oncogéniques de la protéine p53 que ce soit pour la

20 coopération oncogénique avec la forme activée de la protéine Ras ou pour l'effet prolifératif.

De plus, les protéines C-mbp1, MBP1 et C-fibuline2 présentent une activité proliférative intrinsèque, et la protéine C-mbp1 agit comme un oncogène immortalisant en coopérant avec la forme activée de la protéine Ras pour la

25 transformation cellulaire.

Les résultats présentés dans les différents exemples montrent que les protéines ou polypeptides C-mbp1, MBP1 et C-fibuline2 interagissent spécifiquement avec les formes mutantes de la protéine p53 et que ces interactions conduisent à une synergie entre ces protéines et les mutants oncogéniques de la protéine p53 que ce soit pour la

coopération oncogénique avec la forme activée de la protéine Ras ou pour l'effet prolifératif.

De plus, les protéines C-mbp1, MBP1 et C-fibuline2 présentent une activité proliférative intrinsèque, et les protéines C-mbp1 et MBP1 agissent comme des
5 oncogènes immortalisants en coopérant avec la forme activée de la protéine Ras pour la transformation cellulaire.

Ces propriétés confèrent à MBP1 un rôle potentiel d'oncogène. Dans au moins un des test (exemple 8 bis) la protéine MBP1 présente des propriétés oncogéniques accrues par rapport au polypeptide c-MBP1.

10 Enfin, la forte homologie présentée par les protéines MBP1 humaine et murine (95% d'identité stricte), et la similarité d'expression tissulaire de leurs messagers respectifs, permettent de conclure que la protéine MBP1 humaine, qui pourrait être présente sous forme de deux variants différents (2 messagers distincts), possède(ent) des propriétés analogues à celles de son homologue murine.

15 En conclusion, ces résultats décrivent la caractérisation d'une nouvelle protéine murine, MBP1, et de son(ses) homologue(s) humaine(s), qui présente des propriétés oncogéniques et qui interagit spécifiquement avec les formes mutées de la protéine p53. Cette interaction qui se traduit par un accroissement des propriétés oncogéniques de MBP1, pourrait constituer un élément fondamental de la capacité
20 oncogénique de ces mutants de la protéine p53.

De telles propriétés semblent aussi partagées par une autre protéine présentant des homologies avec MBP1, la fibuline 2. Cette protéine faisant partie d'une famille plus large, on peut envisager que ces propriétés puissent être étendues à l'ensemble des membres de la famille des fibulines.

25 Ces interactions montrant une forte synergie entre les pouvoirs oncogéniques des protéines MBP1, fibuline2 et mutants p53, elles constituent un point d'action potentiel dans le traitement des cancers liés aux mutations de la protéine p53. De

plus, les protéines MBP1 et fibuline2 qui présentent des propriétés oncogéniques intrinsèques constituent des cibles potentielles pour le traitement du cancer en général.

5 Exemple 10 - Localisation chromosomique du gène *MBP1* humain

La localisation chromosomique du gène *MBP1* a été effectuée selon un protocole en quatre étapes (Lichter et al, Science 247 (1990) 64) (Heng et al, Chromosoma 102 (1993) 325) (Kischkel et al, Cytogenet. Cell Genet. 82 (1998) 95) :

- 10 - marquage de l'ADNc à la biotine par nick-translation
- hybridation sur métaphases humaines normales (technologie en haute résolution)
- révélation par la fluorescéine
- visualisation et interprétation sur microscope à épifluorescence

15 Cette étude d'hybridation de la sonde MBP1 sur métaphases humaines a été effectuée par analyse de 30 mitoses et a montré la présence d'un double spot sur les bras longs (bras q) des deux chromosomes 11 en 11q13. De façon intéressante, cette région du chromosome 11 a été associée à un grand nombre de pathologies :

- 20 - maladie de Mac Ardle (Lebo et al, Science 225 (1984) 57)
- Syndrome de Usher de type 1B (Weil et al, Nature 374 (1995) 60)
- néoplasie endocrine de type I (Teh et al, J. Intern. Med. 238 (1995) 249)
- dystrophie de Best (Graff et al, Genomics 24 (1994) 425)
- 25 - diabète insulino-dépendant (Davies et al, Nature 371 (1994) 130)
- spinocerebellar ataxia 5 (Ranum et al, Nature Genet. 8 (1994) 280)
- syndrome de Bardet-Biedl (Leppert et al, Nature Genet. 7 (1994) 108)
- ostéoporose (Gong et al, Am. J. Hum. Genet. 59 (1996) 146)

30 De plus cette région du chromosome 11 est aussi le site d'événements d'amplification associées à différentes de tumeurs solides (oesophage, tête et cou,

vessie, sein et poumon) (Lammie & Peters, Cancer Cells 3 (1991) 413).

Le gène *MBP1* pourrait donc être non seulement associé à un certain nombre de cancers mais aussi à un grand nombre de pathologies présentant des désordres de types rénaux, neuro-dégénératifs, osseux et autres. Parmi ces pathologies on peut citer notamment : les déficiences rénales aiguës telles celles associées à la maladie de Mac Ardle, les retinis pigmentosa et certaines formes de cécité et de surdité telles que celles associées au Syndrome de Usher de type 1B, l'hyperthyroïdie telle la forme associée à la néoplasie endocrine de type I, les pathologies liées à un défaut de pigmentation rétinienne telles que celles rencontrées dans la dystrophie de Best, le diabète insulino-dépendant, les pathologies neurodégénératives telles que celles associées à l'ataxie cérébrospinale 5, les dystrophies rétiniennes, les désordres rénaux telles que les formes rencontrées dans le syndrome de Bardet-Biedl, et l'ostéoporose.

15 **Exemple 11 - Expression de l'ARN messenger codant pour la protéine MBP1 humaine dans des tumeurs du colon**

Cet exemple décrit une analyse semi-quantitative de l'expression de l'ARN messenger codant pour la protéine MBP1 humaine, effectuée en parallèle sur 9 tumeurs du colon et 9 prélèvements de tissus sains (colon) provenant des mêmes patients.

Les prélèvements ont été congelés à -70°C immédiatement après ressection et l'ARN total a été préparé par homogénéisation de 100mg de tissu en utilisant la solution RNA NOW (Ozyme) et le protocole recommandé par le fournisseur. Par la suite, une synthèse d'ADNc a été effectuée à l'aide du kit First-Strand cDNA Synthesis (Amersham Pharmacia Biotech) en utilisant 1,5 µg d'ARN total et selon les recommandations du fournisseur. Puis les gènes MBP1 et β -actine (contrôle) ont été amplifiés par PCR en utilisant une quantité d'ADNc pour laquelle le niveau de produit de PCR est directement corrélable avec la concentration de substrat et le programme de cycles suivant :

	1 cycle	2min à 95°C
	30 cycles	30sec à 94 1min à 45°C 1min à 72°C
5	1 cycle	3min à 72°C

Les oligonucléotides utilisés pour ces amplifications sont les suivants :

10

Oligonucléotide sens-MBP1 (SEQ ID N° 27)

GCCCTGATGGTTACCGCAAGA

15

Oligonucléotide antisens-MBP1 (SEQ ID N° 28)

AGCCCCCATGGAAGTTGACAC

20

Oligonucléotide sens- β -actin (SEQ ID N° 29)

GTGGGGCGCCCCAGGCACCA

Oligonucléotide antisens- β -actin (SEQ ID N° 26)

CGGTTGGCCTTGGGGTTCAGGGGGG

Les produits de PCR ainsi générés ont ensuite été analysés par électrophorèses sur gel d'agarose à 1%.

25

Les résultats présentés dans la figure 8 montrent clairement que l'ARN messager codant pour la protéine MBP1 humaine est amplifié dans cinq des tumeurs étudiées en comparaison avec le tissu sain provenant du même patient, et ce, quelque soit le grade de la tumeur et indépendamment de leur statut concernant les gènes Ras et p53.

30

Les résultats de cet exemple montrent donc qu'une amplification de l'ARN messager codant pour la protéine MBP1 humaine peut-être décelée dans certains

types de tumeurs humaines et soulignent donc un rôle potentiel de la protéine MBP1 dans l'apparition et/ou le développement de ces tumeurs.

REVENDICATIONS

1. Polypeptide capable d'interagir spécifiquement avec les formes oncogéniques de p53, de stimuler la croissance cellulaire et de bloquer les effets anti-prolifératifs de la forme sauvage de p53.

5 2. Polypeptide selon la revendication 1, caractérisé en ce qu'il comprend tout ou partie d'une séquence choisie parmi les séquences polypeptidiques SEQ ID N° 9 ou SEQ ID N°16 ou un dérivé de celles-ci.

10 3. Polypeptide selon la revendication 1, caractérisé en ce qu'il comprend tout ou partie d'une séquence choisie parmi les séquences polypeptidiques SEQ ID N°31 ou SEQ ID N°22 ou un dérivé de celles-ci.

4. Polypeptide selon la revendication 1, caractérisé en ce qu'il comprend tout ou partie de la séquence polypeptidique SEQ ID N° 33 ou un dérivé de celle-ci.

5. Polypeptide selon la revendication 3, caractérisé en ce qu'il est représenté par la séquence polypeptidique SEQ ID N°22.

15 6. Séquence nucléotidique codant pour un polypeptide tel que défini selon l'une des revendications 1 à 5.

7. Séquence nucléotidique selon la revendication 6 caractérisée en ce qu'elle comprend tout ou partie de la séquence SEQ ID N° 15 ou de la SEQ ID N° 21 ou de leurs dérivées.

20 8. Séquence nucléotidique selon la revendication 6 caractérisée en ce qu'elle comprend tout ou partie de la séquence nucléotidique SEQ ID N° 32 ou de ses dérivées.

9. Séquence nucléotidique selon la revendication 6 ou 7 caractérisée en ce qu'elle comprend la séquence SEQ ID N°15 ou la séquence SEQ ID N°30.

10. Séquence nucléotidique selon la revendication 6, 7 ou 9 caractérisée en ce qu'elle est représentée en SEQ ID N° 21.

5 11. Cellule hôte pour la production de polypeptide selon l'une des revendications 1 à 5, caractérisée en ce qu'elle a été transformée avec un acide nucléique comportant une séquence nucléotidique selon l'une des revendications 6 à 10.

10 12. Procédé de préparation d'un polypeptide selon l'une des revendications 1 à 5 caractérisé en ce que l'on cultive une cellule contenant une séquence nucléotidique selon l'une des revendications 6 à 10 dans des conditions d'expression de ladite séquence et on récupère le polypeptide produit.

13. Cassette d'expression comprenant une séquence nucléotidique codant pour un polypeptide selon l'une des revendications 6 à 10.

15 14. Vecteur comprenant une séquence nucléotidique selon l'une des revendications 6 à 10.

15. Vecteur selon la revendication 14 caractérisé en ce qu'il s'agit d'un vecteur plasmidique, d'un cosmide ou de tout ADN non encapsidé par un virus.

20 16. Vecteur selon la revendication 14 caractérisé en ce qu'il s'agit d'un virus recombinant, et de préférence d'un virus recombinant défectif pour la réplication.

17. Oligonucléotide antisens d'une séquence selon la revendication 7 à 10 capable d'inhiber au moins partiellement la production de polypeptides selon l'une des revendications 1 à 5.

18. Sonde nucléotidique capable de s'hybrider avec une séquence nucléotidique selon l'une des revendications 7 à 10 ou l'ARNm correspondant.

19. Anticorps ou fragment d'anticorps dirigé contre un polypeptide selon l'une des revendications 1 à 5.

5 20. Anticorps ou fragment d'anticorps selon la revendication 19 caractérisé en ce qu'il est dirigé contre une séquence choisie parmi les séquences peptidiques présentées en SEQ ID N° 9 ou SEQ ID N°33 ou SEQ ID N°31 ou SEQ ID N°22.

10 21. Anticorps ou fragment d'anticorps selon la revendication 19 ou 20 caractérisé en ce qu'il possède la faculté de prévenir l'interaction entre les formes oncogéniques de p53 et un polypeptide selon l'une des revendications 1 à 5.

22. Procédé de mise en évidence ou d'identification de composés capables de se lier avec un polypeptide tel que défini selon l'une des revendications 1 à 5, caractérisé en ce que l'on réalise les étapes suivantes :

15 a - on met en contact une molécule ou un mélange contenant différentes molécules, éventuellement non-identifiées, avec un polypeptide tel que défini selon l'une des revendications 1 à 5 dans des conditions permettant l'interaction entre ledit polypeptide et ladite molécule dans le cas où celle-ci posséderait une affinité pour ledit polypeptide, et,

b - on détecte et/ou isole les molécules liées au dit polypeptide.

20 23. Procédé de mise en évidence ou d'identification de composés capables de moduler ou d'inhiber l'interaction entre les formes oncogéniques de p53 et un polypeptide selon l'une des revendications 1 à 5, caractérisé en ce que l'on réalise les étapes suivantes :

25 a - on réalise la liaison de la forme oncogénique de p53 ou d'un fragment de celle ci avec ledit polypeptide ;

- on ajoute un composé à tester pour sa capacité à inhiber la liaison entre la forme oncogénique de p53 et ledit polypeptide ,

- on détermine le déplacement ou l'inhibition de la liaison entre la forme oncogénique de p53 ;

- 5 - on détecte et/ou isole les composés qui empêchent ou qui gênent la liaison entre la forme oncogénique de p53 et ledit polypeptide ;

24. Ligand d'un polypeptide tel que défini selon les revendications 1 à 5, susceptible d'être obtenu selon le procédé de la revendication 22.

- 10 25. Ligand capable de moduler ou d'inhiber l'interaction entre les formes oncogéniques de p53 et un polypeptide tel que défini selon les revendications 1 à 5, susceptible d'être obtenu selon le procédé de la revendication 23.

26. Utilisation d'un ligand selon la revendication 24 ou 25 pour la préparation d'un médicament destiné au traitement traitement des maladies impliquant un dysfonctionnement du cycle cellulaire.

- 15 27. Utilisation d'un polypeptide capable d'interagir avec les formes mutées oncogéniques de p53 et comprenant tout ou partie d'une séquence peptidique choisie parmi les séquences SEQ ID N° 9, N° 33, N°31, ou N° 22 ou d'un dérivé de celle - ci, selon l'une des revendications 1 à 5 pour la réalisation d'un composé non peptidique ou non exclusivement peptidique capable d'interagir avec les formes
20 mutées oncogéniques de p53, par détermination des éléments structuraux de ce polypeptide qui sont importants pour son activité et reproduction de ces éléments par des structures non peptidiques ou non exclusivement peptidiques.

28. Composition pharmaceutique comprenant comme principe actif au moins un anticorps ou fragment d'anticorps selon l'une des revendications 19 à 21, et/ou un

oligonucléotide antisens selon la revendication 17 et/ou un ligand selon l'une des revendications 24 ou 25 et/ou un composé selon la revendication 27.

29. Composition selon la revendication 28 destinée au traitement des maladies impliquant un dysfonctionnement du cycle cellulaire.

5 30. Composition selon la revendication 29 destinée au traitement des cancers.

ST 98033
Etranger

BREVET D'INVENTION

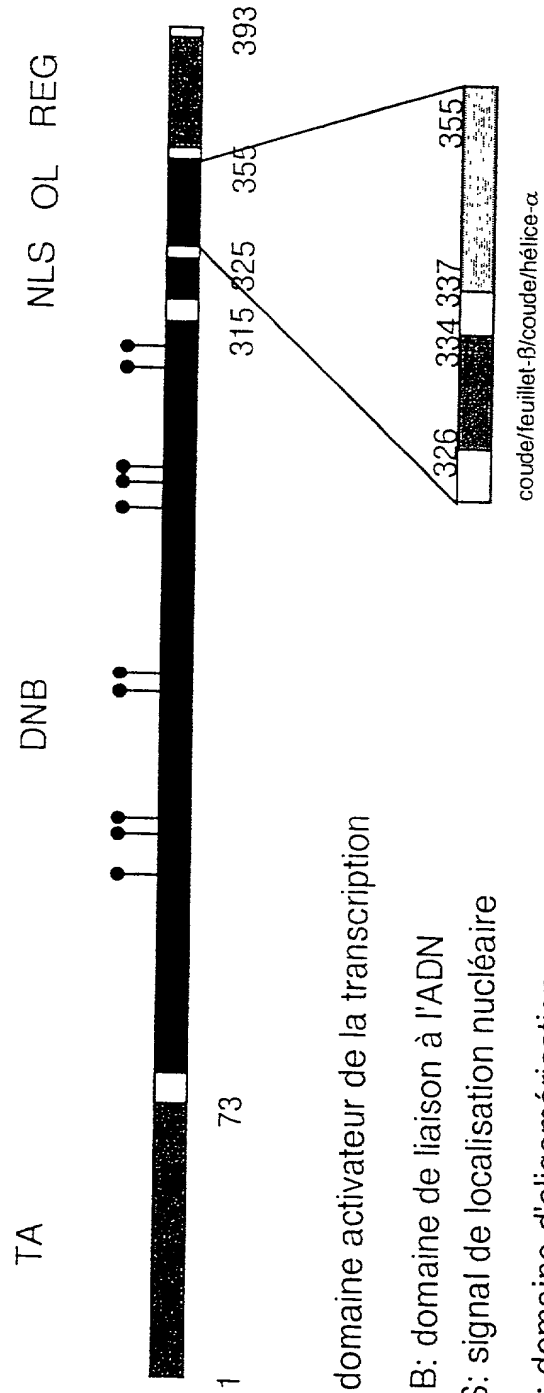
POLYPEPTIDES CAPABLES D'INTERAGIR AVEC LES MUTANTS
ONCOGENIQUES DE LA PROTEINE P53

RHONE-POULENC RORER S.A.

ABREGE

La présente invention concerne le domaine de la biologie et de la régulation du cycle cellulaire. Plus particulièrement, la présente invention concerne de nouveaux polypeptides capables d'interagir spécifiquement avec les formes oncogéniques de la protéine p53.

STRUCTURE DE LA p53



TA: domaine activateur de la transcription

DNB: domaine de liaison à l'ADN

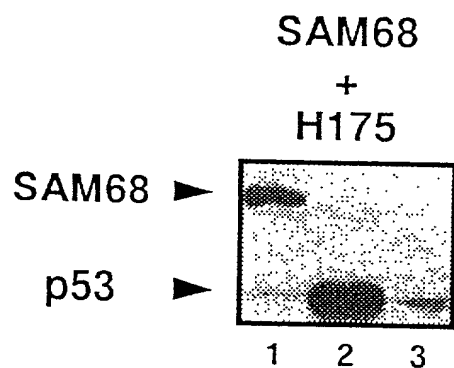
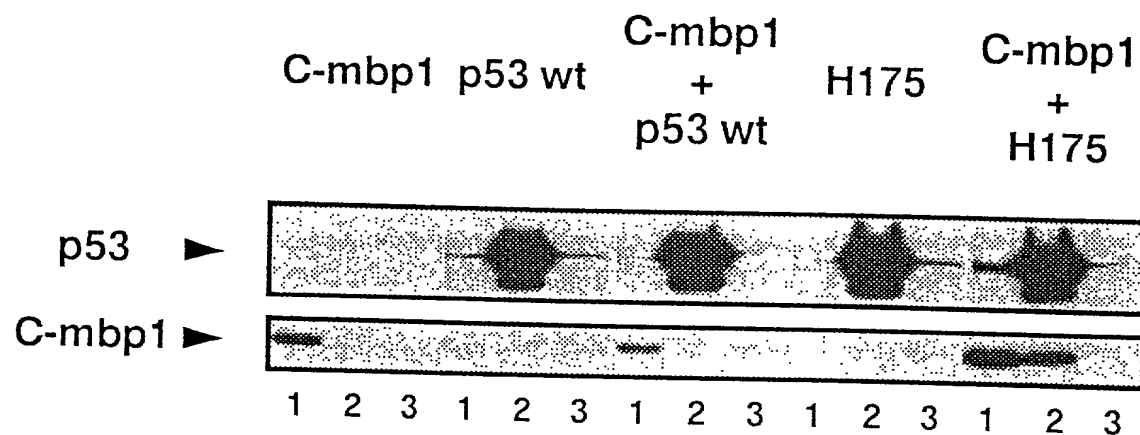
NLS: signal de localisation nucléaire

OL: domaine d'oligomérisation

REG: domaine de régulation

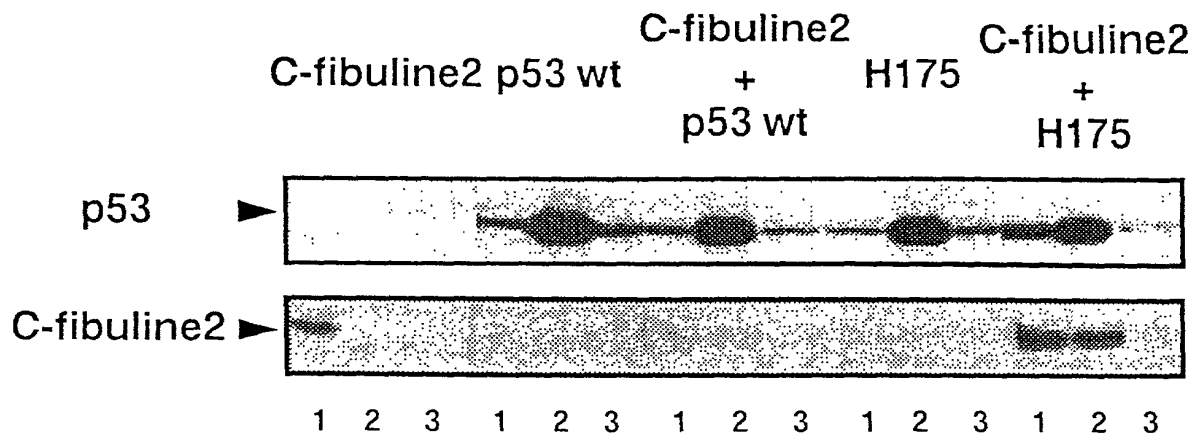
● cystéine

Figure 1



1: anticorps anti-myc (9E10)
 2: anticorps anti-p53 (DO1)
 3: anticorps non spécifique (PAb416)

Figure 2



- 1: anticorps anti-myc (9E10)
- 2: anticorps anti-p53 (DO1)
- 3: anticorps non spécifique (PAb416)

Figure 3

murine
humaine

```

-----AVAETPDFCPPP-PSLRMLPFASCLPGSLLLWAFLLLLLGAASPQDPEEPDSYTEC
SQPSRQSRGPRGCRGNP--RMLPCASCLPGSLLLWALLLLLLLGSASPQDSEEPDSYTEC
:..* * * * * *****:*****.*****

```

murine
humaine

```

TDGYEWDADSQHCRDVNECLTPEACKGEMKCINHYGYLCLPRSAAVISDLHGEGPPPP
TDGYEWDPDQSQHCRDVNECLTPEACKGEMKCINHYGYLCLPRSAAVISDLHGEGPPPP
*****.*****.*****.*****.*****

```

murine
humaine

```

AAHAQQPNPCPGYEPDEQESCVDVDECTQALHDCRPSQDCHNLPGSYQCTCPDGYRKIG
VPPAQHPNPCPGYEPDDQDSCVDVDECAQALHDCRPSQDCHNLPGSYQCTCPDGYRKIG
..**:* *****:*****.*****.*****.*****

```

murine
humaine

```

PECVDIDECRYRYCQHRCVNLPGSFRCQCEPGFQLGPNNRSCVDVNECDMGAPCEQRCFN
PECVDIDECRYRYCQHRCVNLPGSFRCQCEPGFQLGPNNRSCVDVNECDMGAPCEQRCFN
*****

```

Figure 4a

murine
humaine

SYGTFLCRCNQGYELHRDGFSCSDIDECGYSSYLCQYRCVNEPGRFSCHCPQGYQLLATR
SYGTFLCRCHQGYELHRDGFSCSDIDECYSSYLCQYRCVNEPGRFSCHCPQGYQLLATR
*****:*****.*****:*****:*****:*****:*****:*****

murine
humaine

LCQDIDECETGAHQCEAQTCVNFHGGYRCVDTNRCVEPYVQVSDNRCLCPASNPLCREQ
LCQDIDECESGAHQCEAQTCVNFHGGYRCVDTNRCVEPYIQVSENRCCLCPASNPLCREQ
*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****

murine
humaine

PSSIVHRYMSITERSVPADVFIQATSVYPGAYNAFQIRSGNTQGDFYIRQINNVSAML
PSSIVHRYMTITERSVPADVFIQATSVYPGAYNAFQIRAGNSQGDYFIRQINNVSAML
*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****

murine
humaine

VLARPVTGPREYVLDLEMVTMNSLMSYRASSVLRLTVFVGAYTF
VLARPVTGPREYVLDLEMVTMNSLMSYRASSVLRLTVFVGAYTF
*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****

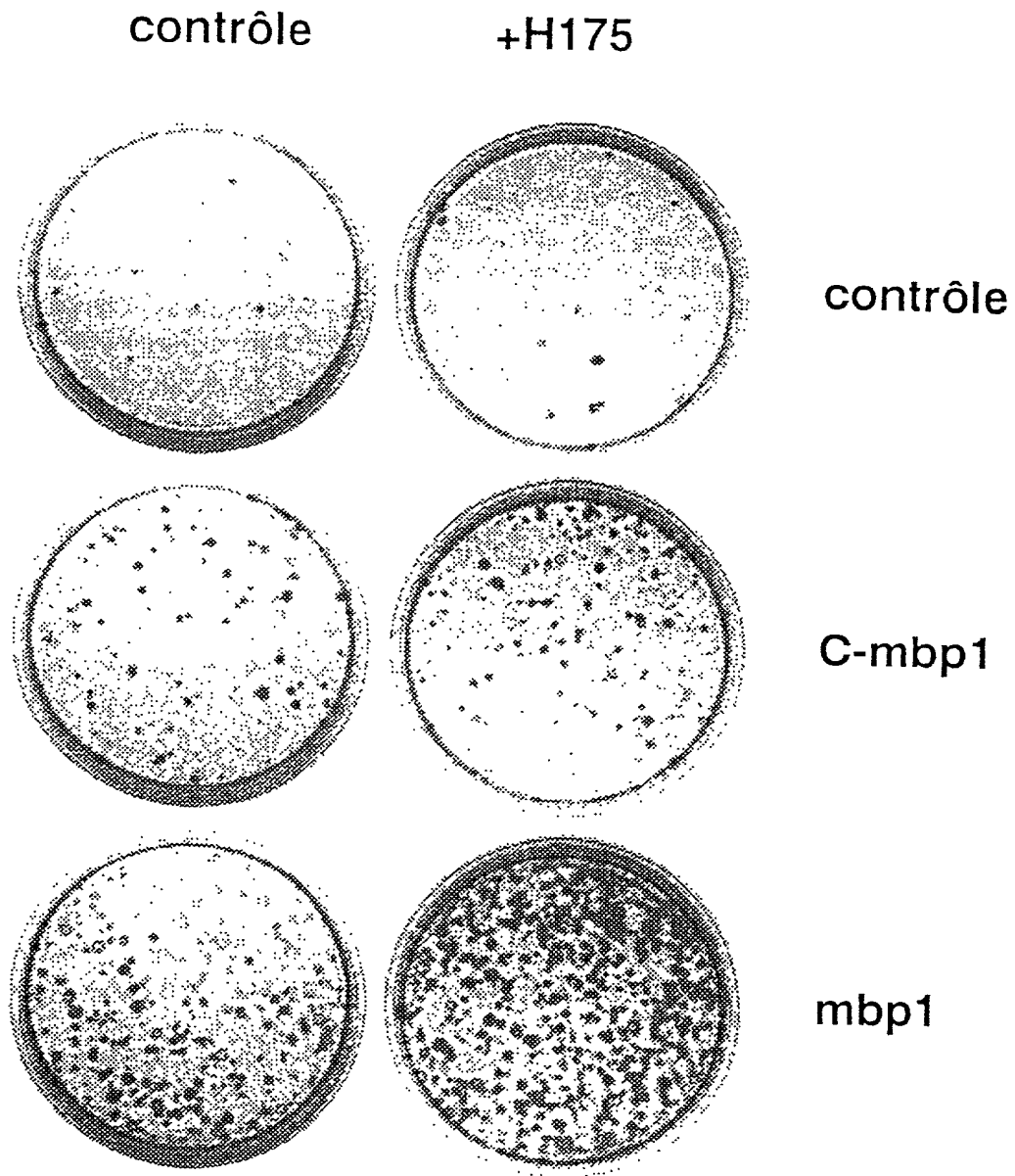


Figure 5

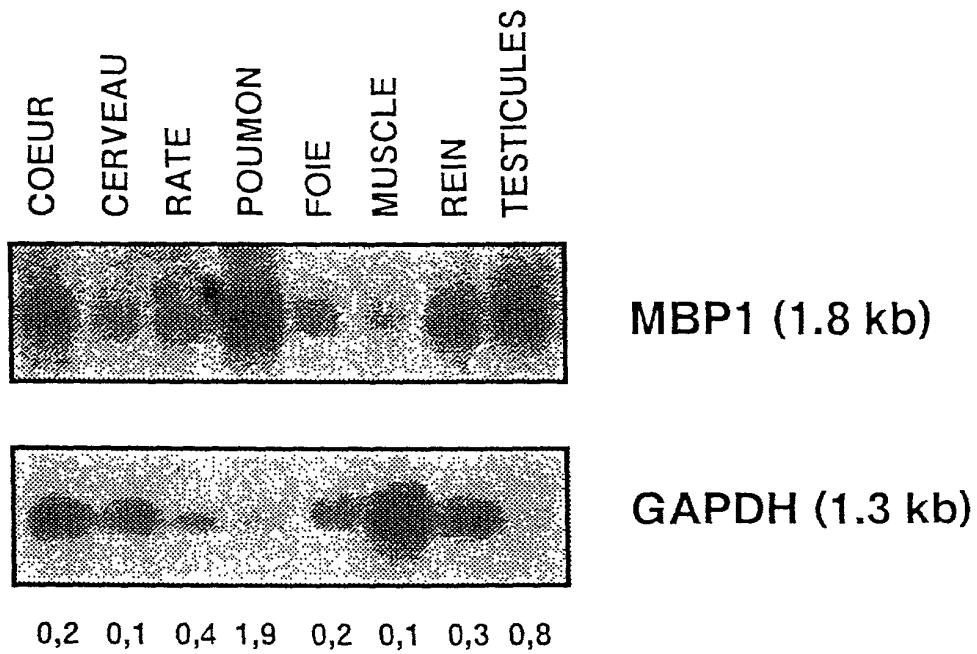
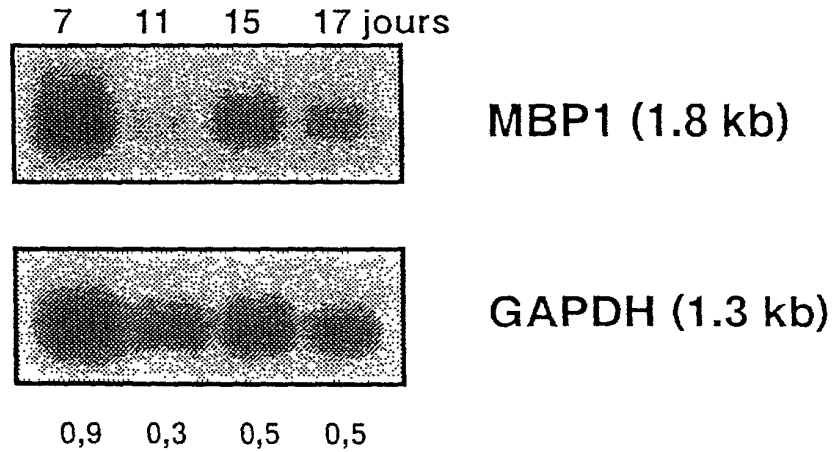


Figure 6

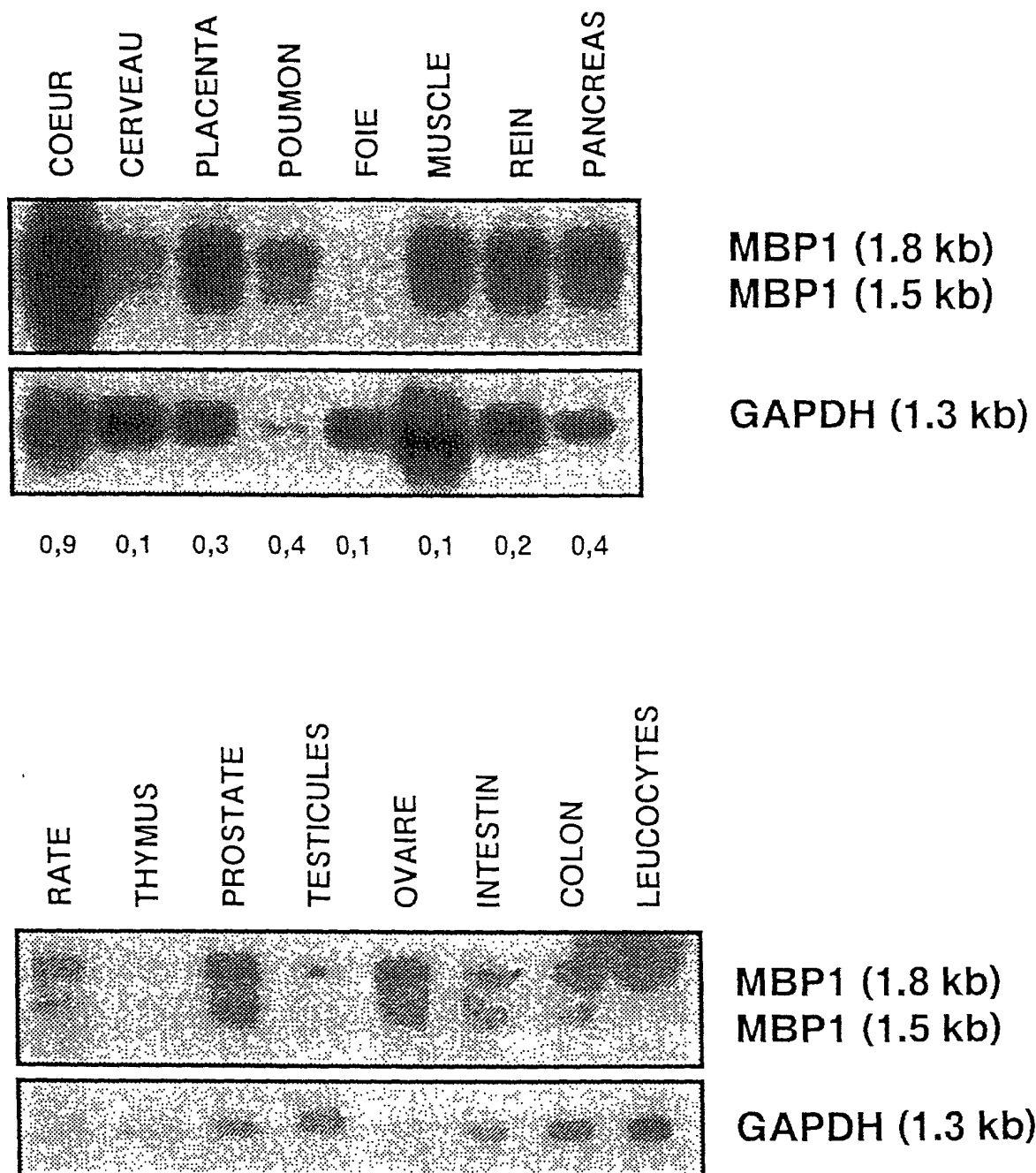


Figure 7

PATIENT

1	2	3	4	5	6	7	8	9	contrôle
N	T	N	T	N	T	N	T	N	T
MBP1									
β-actine									
↓	↑	—	↑	↑	↑	—	—	↑	
H175	H175	C273	sauvage	H273	H175	sauvage	sauvage	H175	
sauvage	Asp12	sauvage	Ala12	Cys12	sauvage	Asp12	Asp12	sauvage	
B2	B2	4	3	4	2	1	4	3	
		Metastatique	Metastatique	Metastatique			Metastatique		
colon droit	colon droit	colon gauche	colon gauche	colon gauche	colon gauche	colon gauche	rectum	rectum	
									Origine de la tumeur

Figure 8

LISTE DE SEQUENCES

	<110> Rhône-Poulenc Rorer	
5	<120> Polypeptides capables d'interagir avec les mutants oncogéniques de la protéine p53	
	<130> Séquences	
10	<140> <141>	
	<150> FR9812754 <151> 1998-10-12	
15	<160> 33	
	<170> PatentIn Ver. 2.1	
20	<210> 1 <211> 23 <212> ADN <213> Séquence artificielle	
25	<220> <223> Description de la séquence artificielle: oligonucléotide	
30	<400> 1 agatctgtat ggaggagccg cag	23
	<210> 2 <211> 29 <212> ADN <213> Séquence artificielle	
35	<220> <223> Description de la séquence artificielle: oligonucléotide3'-393 (p53)	
40	<400> 2 agatctcatc agtctgagtc aggcccttc	29
45	<210> 3 <211> 15 <212> ADN <213> Séquence artificielle	
50	<220> <223> Description de la séquence artificielle: oligonucléotide H175 3'	
55	<400> 3 ggggcagtgc ctcac	15
	<210> 4	

5 <220>
 <223> Description de la séquence artificielle:
 oligonucléotide W248 3'

15 <210> 5
 <211> 15
 <212> ADN
 <213> Séquence artificielle

<400> 5
acaaacatgc acctc 15

<220>
<223> Description de la séquence artificielle:
oligonucléotide G281 3'

40 <210> 7
 <211> 23
 <212> ADN
 <213> Séquence artificielle

<400> 7
agatctgtgt ggcccctgca cca 23

```
<220>  
<221> CDS  
<222> (1)..(885)
```

<220>

<223> Description de la séquence artificielle: fragment

C-term MBP1 murine

5

<400> 8

tgc acc tgc cct gat ggt tac cga aaa att gga ccc gaa tgt gtg gac	48
Cys Thr Cys Pro Asp Gly Tyr Arg Lys Ile Gly Pro Glu Cys Val Asp	
1 5 10 15	

10

ata gat gag tgt cgt tac cgc tat tgc cag cat cga tgt gtg aac ctg	96
Ile Asp Glu Cys Arg Tyr Arg Tyr Cys Gln His Arg Cys Val Asn Leu	
20 25 30	

15

ccg ggc tcc ttt cga tgc cag tgt gag cca ggc ttc cag ttg gga cct	144
Pro Gly Ser Phe Arg Cys Gln Cys Glu Pro Gly Phe Gln Leu Gly Pro	
35 40 45	

20

aac aac cgc tct tgt gtg gat gtg aat gag tgt gac atg gga gcc cca	192
Asn Asn Arg Ser Cys Val Asp Val Asn Glu Cys Asp Met Gly Ala Pro	
50 55 60	

25

tgt gag cag cgc tgc ttc aac tcc tat ggg acc ttc ctg tgt cgc tgt	240
Cys Glu Gln Arg Cys Phe Asn Ser Tyr Gly Thr Phe Leu Cys Arg Cys	
65 70 75 80	

30

aac cag ggc tat gag ctg cac cgg gat ggc ttc tcc tgc agc gat atc	288
Asn Gln Gly Tyr Glu Leu His Arg Asp Gly Phe Ser Cys Ser Asp Ile	
85 90 95	

35

gat gag tgc ggc tac tcc agt tac ctc tgc cag tac cgc tgt gtc aac	336
Asp Glu Cys Gly Tyr Ser Ser Tyr Leu Cys Gln Tyr Arg Cys Val Asn	
100 105 110	

40

gct aca agg ctc tgc caa gat att gac gag tgt gaa aca ggt gca cac	432
Ala Thr Arg Leu Cys Gln Asp Ile Asp Glu Cys Glu Thr Gly Ala His	
130 135 140	

45

caa tgt tct gag gcc caa acc tgt gtc aac ttc cat ggg ggt tac cgc	480
Gln Cys Ser Glu Ala Gln Thr Cys Val Asn Phe His Gly Gly Tyr Arg	
145 150 155 160	

50

tgt gtg gac acc aac cgt tgt gtg gag ccc tat gtc caa gtg tca gac	528
Cys Val Asp Thr Asn Arg Cys Val Glu Pro Tyr Val Gln Val Ser Asp	
165 170 175	

55

aac cgc tgc ctc tgc cct gcc tcc aat ccc ctt tgt cga gag cag cct	576
Asn Arg Cys Leu Cys Pro Ala Ser Asn Pro Leu Cys Arg Glu Gln Pro	
180 185 190	

tca tcc att gtg cac cgc tac atg agc atc acc tca gag cga agt gtg	624
Ser Ser Ile Val His Arg Tyr Met Ser Ile Thr Ser Glu Arg Ser Val	
195 200 205	

cct gct gac gtg ttt cag atc cag gca acc tct gtc tac cct ggt gcc	672
---	-----

Pro Ala Asp Val Phe Gln Ile Gln Ala Thr Ser Val Tyr Pro Gly Ala
 210 215 220

5 tac aat gcc ttt cag atc cgt tct gga aac aca cag ggg gac ttc tac 720
 Tyr Asn Ala Phe Gln Ile Arg Ser Gly Asn Thr Gln Gly Asp Phe Tyr
 225 230 235 240

10 att agg caa atc aac aat gtc agc gcc atg ctg gtc ctc gcc agg cca 768
 Ile Arg Gln Ile Asn Asn Val Ser Ala Met Leu Val Leu Ala Arg Pro
 245 250 255

15 gtg acg gga ccc cgg gag tac gtg ctg gac ctg gag atg gtc acc atg 816
 Val Thr Gly Pro Arg Glu Tyr Val Leu Asp Leu Glu Met Val Thr Met
 260 265 270

20 aat tcc ctt atg agc tac cgg gcc agc tct gta ctg aga ctc acg gtc 864
 Asn Ser Leu Met Ser Tyr Arg Ala Ser Ser Val Leu Arg Leu Thr Val
 275 280 285

25 ttt gtg gga gcc tat acc ttc tgaagacct cagggaagg ccatgtgggg 915
 Phe Val Gly Ala Tyr Thr Phe
 290 295

30 gccccctccc cctcccatag cttaagcagc cccggggggc tagggatgac cgttctgctt 975
 aaaggaacta tgatgtgaag gacaataaag ggagaaagaa ggaaaa 1021

35 <210> 9
 <211> 295
 <212> PRT
 <213> Séquence artificielle
 <223> Description de la séquence artificielle: fragment
 C-term MBP1 murine

40 <400> 9
 Cys Thr Cys Pro Asp Gly Tyr Arg Lys Ile Gly Pro Glu Cys Val Asp
 1 5 10 15

45 Ile Asp Glu Cys Arg Tyr Arg Tyr Cys Gln His Arg Cys Val Asn Leu
 20 25 30

50 Pro Gly Ser Phe Arg Cys Gln Cys Glu Pro Gly Phe Gln Leu Gly Pro
 35 40 45

55 Asn Asn Arg Ser Cys Val Asp Val Asn Glu Cys Asp Met Gly Ala Pro
 50 55 60

60 Cys Glu Gln Arg Cys Phe Asn Ser Tyr Gly Thr Phe Leu Cys Arg Cys
 65 70 75 80

65 Asn Gln Gly Tyr Glu Leu His Arg Asp Gly Phe Ser Cys Ser Asp Ile
 85 90 95

70 Asp Glu Cys Gly Tyr Ser Ser Tyr Leu Cys Gln Tyr Arg Cys Val Asn
 100 105 110

75 Glu Pro Gly Arg Phe Ser Cys His Cys Pro Gln Gly Tyr Gln Leu Leu
 115 120 125

Ala Thr Arg Leu Cys Gln Asp Ile Asp Glu Cys Glu Thr Gly Ala His
 130 135 140

5 Gln Cys Ser Glu Ala Gln Thr Cys Val Asn Phe His Gly Gly Tyr Arg
 145 150 155 160

Cys Val Asp Thr Asn Arg Cys Val Glu Pro Tyr Val Gln Val Ser Asp
 165 170 175

10 Asn Arg Cys Leu Cys Pro Ala Ser Asn Pro Leu Cys Arg Glu Gln Pro
 180 185 190

15 Ser Ser Ile Val His Arg Tyr Met Ser Ile Thr Ser Glu Arg Ser Val
 195 200 205

Pro Ala Asp Val Phe Gln Ile Gln Ala Thr Ser Val Tyr Pro Gly Ala
 210 215 220

20 Tyr Asn Ala Phe Gln Ile Arg Ser Gly Asn Thr Gln Gly Asp Phe Tyr
 225 230 235 240

Ile Arg Gln Ile Asn Asn Val Ser Ala Met Leu Val Leu Ala Arg Pro
 245 250 255

25 Val Thr Gly Pro Arg Glu Tyr Val Leu Asp Leu Glu Met Val Thr Met
 260 265 270

30 Asn Ser Leu Met Ser Tyr Arg Ala Ser Ser Val Leu Arg Leu Thr Val
 275 280 285

Phe Val Gly Ala Tyr Thr Phe
 290 295

35

<210> 10

<211> 39

<212> ADN

40

<213> Séquence artificielle

<220>

<223> Description de la séquence artificielle:
 oligonucléotide c-myc 5'

45

<400> 10

gatccatgga gcagaagctg atctccgagg aggacctga

39

50

<210> 11

<211> 39

<212> ADN

<213> Séquence artificielle

55

<220>

<223> Description de la séquence artificielle:
 oligonucléotide c-myc 3'

<400> 11

gatctcaggt cctcctcgga gatcagcttc tgcctcatg

39

5 <210> 12
 <211> 45
 <212> ADN
 <213> Séquence artificielle

10 <220>
 <223> Description de la séquence artificielle:
 oligonucléotide MCS 5'

15 <400> 12
 gatctcgggc gacctgcatg caattcccggtgtgcggcgccg gagct

45

20 <210> 13
 <211> 37
 <212> ADN
 <213> Séquence artificielle

25 <220>
 <223> Description de la séquence artificielle:
 oligonucléotide MCS 3'

<400> 13
 cgcggcgcca cccgggaatt gcatgcaggt cgaccga

37

30 <210> 14
 <211> 22
 <212> ADN
 <213> Séquence artificielle

35 <220>
 <223> Description de la séquence artificielle:
 oligonucléotide 3'mMBP1

40 <400> 14
 cgggtactggc agaggtaact gg

22

45 <210> 15
 <211> 1513
 <212> ADN
 <213> Séquence artificielle

50 <220>
 <221> CDS
 <222> (49)..(1377)

55 <220>
 <223> Description de la séquence artificielle: MBP1
 murine (séquence complète)

<400> 15
 gctgtggcag aaaccctga cttctgccca ccacctccca gcctcagg atg ctc cct 57
 Met Leu Pro

5	ttt gcc tcc tgc ctc ccc ggg tct ttg ctg ctc tgg gcg ttt ctg ctg	105
	Phe Ala Ser Cys Leu Pro Gly Ser Leu Leu Leu Trp Ala Phe Leu Leu	
	5 10 15	
10	ttg ctc ttg gga gca gcg tcc cca cag gat ccc gag gag ccg gac agc	153
	Leu Leu Leu Gly Ala Ala Ser Pro Gln Asp Pro Glu Glu Pro Asp Ser	
	20 25 30 35	
15	tac acg gaa tgc aca gat ggc tat gag tgg gat gca gac agc cag cac	201
	Tyr Thr Glu Cys Thr Asp Gly Tyr Glu Trp Asp Ala Asp Ser Gln His	
	40 45 50	
20	tgc cgg gat gtc aac gag tgc ctg acc atc ccg gag gct tgc aag ggt	249
	Cys Arg Asp Val Asn Glu Cys Leu Thr Ile Pro Glu Ala Cys Lys Gly	
	55 60 65	
25	gag atg aaa tgc atc aac cac tac ggg ggt tat ttg tgt ctg cct cgc	297
	Glu Met Lys Cys Ile Asn His Tyr Gly Gly Tyr Leu Cys Leu Pro Arg	
	70 75 80	
30	tct gct gcc gtc atc agt gat ctc cat ggt gaa gga cct cca ccg cca	345
	Ser Ala Ala Val Ile Ser Asp Leu His Gly Glu Gly Pro Pro Pro Pro	
	85 90 95	
35	gcg gcc cat gct caa caa cca aac cct tgc ccg cag ggc tac gag cct	393
	Ala Ala His Ala Gln Gln Pro Asn Pro Cys Pro Gln Gly Tyr Glu Pro	
	100 105 110 115	
40	gat gaa cag gag agc tgt gtg gat gtg gac gag tgt acc cag gct ttg	441
	Asp Glu Gln Glu Ser Cys Val Asp Val Asp Glu Cys Thr Gln Ala Leu	
	120 125 130	
45	cat gac tgt cgc cct agt cag gac tgc cat aac ctt cct ggc tcc tac	489
	His Asp Cys Arg Pro Ser Gln Asp Cys His Asn Leu Pro Gly Ser Tyr	
	135 140 145	
50	cag tgc acc tgc cct gat ggt tac cga aaa att gga ccc gaa tgt gtg	537
	Gln Cys Thr Cys Pro Asp Gly Tyr Arg Lys Ile Gly Pro Glu Cys Val	
	150 155 160	
55	gac ata gat gag tgt cgt tac cgc tat tgc cag cat cga tgt gtg aac	585
	Asp Ile Asp Glu Cys Arg Tyr Arg Tyr Cys Gln His Arg Cys Val Asn	
	165 170 175	
60	ctg ccg ggc tct ttt cga tgc cag tgt gag cca ggc ttc cag ttg gga	633
	Leu Pro Gly Ser Phe Arg Cys Gln Cys Glu Pro Gly Phe Gln Leu Gly	
	180 185 190 195	
65	cct aac aac cgc tct tgt gtg gat gtg aat gag tgt gac atg gga gcc	681
	Pro Asn Asn Arg Ser Cys Val Asp Val Asn Glu Cys Asp Met Gly Ala	
	200 205 210	
70	cca tgt gag cag cgc tgc ttc aac tcc tat ggg acc ttc ctg tgt cgc	729
	Pro Cys Glu Gln Arg Cys Phe Asn Ser Tyr Gly Thr Phe Leu Cys Arg	
	215 220 225	
75	tgt aac cag ggc tat gag ctg cac cgg gat ggc ttc tcc tgc agc gat	777
	Cys Asn Gln Gly Tyr Glu Leu His Arg Asp Gly Phe Ser Cys Ser Asp	

	230	235	240	
5	atc gat gag tgc ggc tac tcc agt tac ctc tgc cag tac cgc tgt gtc Ile Asp Glu Cys Gly Tyr Ser Ser Tyr Leu Cys Gln Tyr Arg Cys Val 245 250 255	825		
10	aac gag cca ggc cga ttc tcc tgt cac tgc cca caa ggc tac cag ctg Asn Glu Pro Gly Arg Phe Ser Cys His Cys Pro Gln Gly Tyr Gln Leu 260 265 270 275	873		
15	ctg gct aca agg ctc tgc caa gat att gac gag tgt gaa aca ggt gca Leu Ala Thr Arg Leu Cys Gln Asp Ile Asp Glu Cys Glu Thr Gly Ala 280 285 290	921		
20	cac caa tgt tct gag gcc caa acc tgt gtc aac ttc cat ggg ggt tac His Gln Cys Ser Glu Ala Gln Thr Cys Val Asn Phe His Gly Gly Tyr 295 300 305	969		
25	cgc tgt gtg gac acc aac cgt tgt gtg gag ccc tat gtc caa gtg tca Arg Cys Val Asp Thr Asn Arg Cys Val Glu Pro Tyr Val Gln Val Ser 310 315 320	1017		
30	gac aac cgc tgc ctc tgc cct gcc tcc aat ccc ctt tgt cga gag cag Asp Asn Arg Cys Leu Cys Pro Ala Ser Asn Pro Leu Cys Arg Glu Gln 325 330 335	1065		
35	cct tca tcc att gtg cac cgc tac atg agc atc acc tca gag cga agt Pro Ser Ser Ile Val His Arg Tyr Met Ser Ile Thr Ser Glu Arg Ser 340 345 350 355	1113		
40	gtg cct gct gac gtg ttt cag atc cag gca acc tct gtc tac cct ggt Val Pro Ala Asp Val Phe Gln Ile Gln Ala Thr Ser Val Tyr Pro Gly 360 365 370	1161		
45	gcc tac aat gcc ttt cag atc cgt tct gga aac aca cag ggg gac ttc Ala Tyr Asn Ala Phe Gln Ile Arg Ser Gly Asn Thr Gln Gly Asp Phe 375 380 385	1209		
50	tac att agg caa atc aac aat gtc agc gcc atg ctg gtc ctc gcc agg Tyr Ile Arg Gln Ile Asn Asn Val Ser Ala Met Leu Val Leu Ala Arg 390 395 400	1257		
55	cca gtg acg gga ccc cgg gag tac gtg ctg gac ctg gag atg gtc acc Pro Val Thr Gly Pro Arg Glu Tyr Val Leu Asp Leu Glu Met Val Thr 405 410 415	1305		
60	atg aat tcc ctt atg agc tac cgg gcc agc tct gta ctg aga ctc acg Met Asn Ser Leu Met Ser Tyr Arg Ala Ser Ser Val Leu Arg Leu Thr 420 425 430 435	1353		
65	gtc ttt gtg gga gcc tat acc ttc tgaagaccct cagggaaggg ccatgtgggg Val Phe Val Gly Ala Tyr Thr Phe 440	1407		
70	gccccctccc cctcccatag cttaagcagc cccggggggc tagggatgac cgttctgctt aaaggaacta tgatgtgaag gacaataaag ggagaaagaa ggaaaa	1467	1513	

<210> 16
 <211> 443
 <212> PRT
 <213> Séquence artificielle
 5 <223> Description de la séquence artificielle: MBP1
 murine (séquence complète)

<400> 16
 10 Met Leu Pro Phe Ala Ser Cys Leu Pro Gly Ser Leu Leu Leu Trp Ala
 1 5 10 15
 Phe Leu Leu Leu Leu Leu Gly Ala Ala Ser Pro Gln Asp Pro Glu Glu
 20 25 30
 15 Pro Asp Ser Tyr Thr Glu Cys Thr Asp Gly Tyr Glu Trp Asp Ala Asp
 35 40 45
 Ser Gln His Cys Arg Asp Val Asn Glu Cys Leu Thr Ile Pro Glu Ala
 50 55 60
 20 Cys Lys Gly Glu Met Lys Cys Ile Asn His Tyr Gly Gly Tyr Leu Cys
 65 70 75 80
 Leu Pro Arg Ser Ala Ala Val Ile Ser Asp Leu His Gly Glu Gly Pro
 85 90 95
 25 Pro Pro Pro Ala Ala His Ala Gln Gln Pro Asn Pro Cys Pro Gln Gly
 100 105 110
 30 Tyr Glu Pro Asp Glu Gln Glu Ser Cys Val Asp Val Asp Glu Cys Thr
 115 120 125
 Gln Ala Leu His Asp Cys Arg Pro Ser Gln Asp Cys His Asn Leu Pro
 130 135 140
 35 Gly Ser Tyr Gln Cys Thr Cys Pro Asp Gly Tyr Arg Lys Ile Gly Pro
 145 150 155 160
 Glu Cys Val Asp Ile Asp Glu Cys Arg Tyr Arg Tyr Cys Gln His Arg
 165 170 175
 40 Cys Val Asn Leu Pro Gly Ser Phe Arg Cys Gln Cys Glu Pro Gly Phe
 180 185 190
 45 Gln Leu Gly Pro Asn Asn Arg Ser Cys Val Asp Val Asn Glu Cys Asp
 195 200 205
 Met Gly Ala Pro Cys Glu Gln Arg Cys Phe Asn Ser Tyr Gly Thr Phe
 210 215 220
 50 Leu Cys Arg Cys Asn Gln Gly Tyr Glu Leu His Arg Asp Gly Phe Ser
 225 230 235 240
 Cys Ser Asp Ile Asp Glu Cys Gly Tyr Ser Ser Tyr Leu Cys Gln Tyr
 245 250 255
 55 Arg Cys Val Asn Glu Pro Gly Arg Phe Ser Cys His Cys Pro Gln Gly
 260 265 270

Tyr Gln Leu Leu Ala Thr Arg Leu Cys Gln Asp Ile Asp Glu Cys Glu
 275 280 285

5 Thr Gly Ala His Gln Cys Ser Glu Ala Gln Thr Cys Val Asn Phe His
 290 295 300

Gly Gly Tyr Arg Cys Val Asp Thr Asn Arg Cys Val Glu Pro Tyr Val
 305 310 315 320

10 Gln Val Ser Asp Asn Arg Cys Leu Cys Pro Ala Ser Asn Pro Leu Cys
 325 330 335

Arg Glu Gln Pro Ser Ser Ile Val His Arg Tyr Met Ser Ile Thr Ser
 340 345 350

15 Glu Arg Ser Val Pro Ala Asp Val Phe Gln Ile Gln Ala Thr Ser Val
 355 360 365

20 Tyr Pro Gly Ala Tyr Asn Ala Phe Gln Ile Arg Ser Gly Asn Thr Gln
 370 375 380

Gly Asp Phe Tyr Ile Arg Gln Ile Asn Asn Val Ser Ala Met Leu Val
 385 390 395 400

25 Leu Ala Arg Pro Val Thr Gly Pro Arg Glu Tyr Val Leu Asp Leu Glu
 405 410 415

Met Val Thr Met Asn Ser Leu Met Ser Tyr Arg Ala Ser Ser Val Leu
 420 425 430

30 Arg Leu Thr Val Phe Val Gly Ala Tyr Thr Phe
 435 440

35

<210> 17
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Séquence artificielle

40

<220>
 <223> Description de la séquence artificielle:
 oligonucléotide 3'hMBP1

45

<400> 17
 ctccgctccg aggtgatggt c 21

50

<210> 18
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Séquence artificielle

55

<220>
 <223> Description de la séquence artificielle:
 oligonucléotide 5'hMBP1

<400> 18
 tgtagctact ccagctacct c 21

5 <210> 19
 <211> 1122
 <212> ADN
 <213> Séquence artificielle

10 <220>
 <223> Description de la séquence artificielle: cDNA MBP1
 humaine (séquence partielle)

<400> 19
 aagccagccg agccgccaga gccgcggggc gcgggggtgt cgcggggcca accccaggat 60
 15 gctcccctgc gcctcctgcc taccggggc tctactgctc tgggcgctgc tactgttgct 120
 cttgggatca gcttctctc aggattctga agagcccgac agctacacgg aatgcacaga 180
 tggctatgag tgggacccag acagccagca ctgccgggat gtcaacgagt gtctgacct 240
 ccctgaggcc tgcaagggg aaatgaagt catcaaccac tacgggggct acttgtgcct 300
 gccccgctcc gctgccgtca tcaacgacct acacggcgag ggacccccgc caccagtgc 360
 20 tcccgtctca caccacaacc cctgccacc aggctatgag cccgacgac aggacagctg 420
 tgtggatgtg gacgagtgtg cccaggccct gcacgactgt cgcgccagcc aggactgcca 480
 taacttgctt ggctcctatc agtgacactg ccctgatggt taccgcaaga tcggggccga 540
 gtgtgtggac atagacgagt gccgctaccg ctactgccag caccgctgct tgaacctgcc 600
 tggctccttc cgtgcccagt gcgagccggg cttccagctg gggcctaaca accgctcctg 660
 25 tgttgatgtg aacgagtgtg acatgggggc cccatgcgag cagcgtgct tcaactccta 720
 tgggaccttc ctgtgtcgt gccaccagg ctatgagctg catcgggatg gcttctcctg 780
 cagtgatatt gatgagtgtg gctactccag ctacctctgt cagtaccgct gcgtcaacga 840
 gccaggccgt ttctcctgcc actgccaca gggttaccag ctgctggcca cagcctctg 900
 ccaagacatt gatgagtgtg agtctgggtg gcaccagtgc tccgaggccc aaacctgtgt 960
 30 caacttccat gggggctacc gctgcgtgga caccaaccgc tgcgtggagc cctacatcca 1020
 ggtctctgag aaccgctgtc tctgcccggc ctccaacct ctatgtcgag agcagccttc 1080
 atccattgtg caccgctaca tgaccatcac ctcgagcgg ag 1122

35 <210> 20
 <211> 684
 <212> ADN
 <213> Séquence artificielle

40 <220>
 <223> Description de la séquence artificielle: cDNA
 MBP1humain (séquence partielle)

<400> 20
 45 tgtagctact ccagctacct ctgtcagtag cgtgctgctca acgagccagg ccgtttctcc 60
 tgccactgcc cacaggggta ccagctgctg gccacacgcc tctgccaaga cattgatgag 120
 tgtgagtctg gtgcgcacca gtgctccgag gcccaaacct gtgtcaactt ccatggggggc 180
 taccgctgctg tggacaccaa ccgctgctg gagccctaca tccaggtctc tgagaaccgc 240
 tgtctctgcc cggcctccaa ccctctatgt cgagagcagc cttcatccat tgtgcaccgc 300
 50 tacatgacca tcacctcgga gggagcgtg cccgctgacg tgttcagat ccaggcgacc 360
 tccgtctacc ccggtgccta caatgccttt cagatccgtg ctggaaactc gcagggggac 420
 ttttacatta ggcaaatcaa caacgtcagc gccatgctgg tctcgcgccg gccggtgacg 480
 ggcccccgag agtacgtgct ggacctggag atggtcacca tgaattccct catgagctac 540
 cgggccagct ctgtactgag gctcaccgtc tttgtagggg cctacacctt ctgaggagca 600
 55 ggagggagcc accctccctg cagctaccct agctgaggag cctgttgtga ggggcagaat 660
 gagaaaggca ataaaggag aaag 684

<210> 21
 <211> 1480

<212> ADN
 <213> Séquence artificielle

 5 <220>
 <221> CDS
 <222> (59)..(1387)

 10 <220>
 <223> Description de la séquence artificielle: MBP1
 humaine (séquence complète)

 <400> 21
 aagccagccg agccgccaga gccgcggggcc gcgggggtgt cgcgggcca accccagg 58

 15 atg ctc ccc tgc gcc tcc tgc cta ccc ggg tct cta ctg ctc tgg gcg 106
 Met Leu Pro Cys Ala Ser Cys Leu Pro Gly Ser Leu Leu Leu Trp Ala
 1 5 10 15

 20 ctg cta ctg ttg ctc ttg gga tca gct tct cct cag gat tct gaa gag 154
 Leu Leu Leu Leu Leu Leu Gly Ser Ala Ser Pro Gln Asp Ser Glu Glu
 20 25 30

 25 ccc gac agc tac acg gaa tgc aca gat ggc tat gag tgg gac cca gac 202
 Pro Asp Ser Tyr Thr Glu Cys Thr Asp Gly Tyr Glu Trp Asp Pro Asp
 35 40 45

 30 agc cag cac tgc cgg gat gtc aac gag tgt ctg acc atc cct gag gcc 250
 Ser Gln His Cys Arg Asp Val Asn Glu Cys Leu Thr Ile Pro Glu Ala
 50 55 60

 35 tgc aag ggg gaa atg aag tgc atc aac cac tac ggg ggc tac ttg tgc 298
 Cys Lys Gly Glu Met Lys Cys Ile Asn His Tyr Gly Gly Tyr Leu Cys
 65 70 75 80

 40 ctg ccc cgc tcc gct gcc gtc atc aac gac cta cac ggc gag gga ccc 346
 Leu Pro Arg Ser Ala Ala Val Ile Asn Asp Leu His Gly Glu Gly Pro
 85 90 95

 45 ccg cca cca gtg cct ccc gct caa cac ccc aac ccc tgc cca cca ggc 394
 Pro Pro Pro Val Pro Pro Ala Gln His Pro Asn Pro Cys Pro Pro Gly
 100 105 110

 50 tat gag ccc gac gat cag gac agc tgt gtg gat gtg gac gag tgt gcc 442
 Tyr Glu Pro Asp Asp Gln Asp Ser Cys Val Asp Val Asp Glu Cys Ala
 115 120 125

 55 cag gcc ctg cac gac tgt cgc ccc agc cag gac tgc cat aac ttg cct 490
 Gln Ala Leu His Asp Cys Arg Pro Ser Gln Asp Cys His Asn Leu Pro
 130 135 140

 ggc tcc tat cag tgc acc tgc cct gat ggt tac cgc aag atc ggg ccc 538
 Gly Ser Tyr Gln Cys Thr Cys Pro Asp Gly Tyr Arg Lys Ile Gly Pro
 145 150 155 160

 gag tgt gtg gac ata gac gag tgc cgc tac cgc tac tgc cag cac cgc 586
 Glu Cys Val Asp Ile Asp Glu Cys Arg Tyr Arg Tyr Cys Gln His Arg
 165 170 175

 tgc gtg aac ctg cct ggc tcc ttc cgc tgc cag tgc gag ccg ggc ttc 634

	Cys	Val	Asn	Leu	Pro	Gly	Ser	Phe	Arg	Cys	Gln	Cys	Glu	Pro	Gly	Phe	
				180					185					190			
5	cag	ctg	ggg	cct	aac	aac	cgc	tcc	tgt	gtt	gat	gtg	aac	gag	tgt	gac	682
	Gln	Leu	Gly	Pro	Asn	Asn	Arg	Ser	Cys	Val	Asp	Val	Asn	Glu	Cys	Asp	
			195				200					205					
10	atg	ggg	gcc	cca	tgc	gag	cag	cgc	tgc	ttc	aac	tcc	tat	ggg	acc	ttc	730
	Met	Gly	Ala	Pro	Cys	Glu	Gln	Arg	Cys	Phe	Asn	Ser	Tyr	Gly	Thr	Phe	
		210					215					220					
15	ctg	tgt	cgc	tgc	cac	cag	ggc	tat	gag	ctg	cat	cgg	gat	ggc	ttc	tcc	778
	Leu	Cys	Arg	Cys	His	Gln	Gly	Tyr	Glu	Leu	His	Arg	Asp	Gly	Phe	Ser	
		225				230					235				240		
	tgc	agt	gat	att	gat	gag	tgt	agc	tac	tcc	agc	tac	ctc	tgt	cag	tac	826
	Cys	Ser	Asp	Ile	Asp	Glu	Cys	Ser	Tyr	Ser	Ser	Tyr	Leu	Cys	Gln	Tyr	
				245					250						255		
20	cgc	tgc	gtc	aac	gag	cca	ggc	cgt	ttc	tcc	tgc	cac	tgc	cca	cag	ggc	874
	Arg	Cys	Val	Asn	Glu	Pro	Gly	Arg	Phe	Ser	Cys	His	Cys	Pro	Gln	Gly	
			260					265						270			
25	tac	cag	ctg	ctg	gcc	aca	cgc	ctc	tgc	caa	gac	att	gat	gag	tgt	gag	922
	Tyr	Gln	Leu	Leu	Ala	Thr	Arg	Leu	Cys	Gln	Asp	Ile	Asp	Glu	Cys	Glu	
		275					280						285				
30	tct	ggc	gag	cac	cag	tgc	tcc	gag	gcc	caa	acc	tgt	gtc	aac	ttc	cat	970
	Ser	Gly	Ala	His	Gln	Cys	Ser	Glu	Ala	Gln	Thr	Cys	Val	Asn	Phe	His	
		290				295						300					
35	ggg	ggc	tac	cgc	tgc	gtg	gac	acc	aac	cgc	tgc	gtg	gag	ccc	tac	atc	1018
	Gly	Gly	Tyr	Arg	Cys	Val	Asp	Thr	Asn	Arg	Cys	Val	Glu	Pro	Tyr	Ile	
		305			310					315					320		
	cag	gtc	tct	gag	aac	cgc	tgt	ctc	tgc	cgc	gcc	tcc	aac	cct	cta	tgt	1066
	Gln	Val	Ser	Glu	Asn	Arg	Cys	Leu	Cys	Pro	Ala	Ser	Asn	Pro	Leu	Cys	
				325					330					335			
40	cga	gag	cag	cct	tca	tcc	att	gtg	cac	cgc	tac	atg	acc	atc	acc	tcg	1114
	Arg	Glu	Gln	Pro	Ser	Ser	Ile	Val	His	Arg	Tyr	Met	Thr	Ile	Thr	Ser	
			340				345							350			
45	gag	cgc	agc	gtg	ccc	gct	gac	gtg	ttc	cag	atc	cag	gag	acc	tcc	gtc	1162
	Glu	Arg	Ser	Val	Pro	Ala	Asp	Val	Phe	Gln	Ile	Gln	Ala	Thr	Ser	Val	
		355					360						365				
50	tac	ccc	ggc	gcc	tac	aat	gcc	ttt	cag	atc	cgt	gct	gga	aac	tcg	cag	1210
	Tyr	Pro	Gly	Ala	Tyr	Asn	Ala	Phe	Gln	Ile	Arg	Ala	Gly	Asn	Ser	Gln	
		370				375					380						
55	ggg	gac	ttt	tac	att	agg	caa	atc	aac	aac	gtc	agc	gcc	atg	ctg	gtc	1258
	Gly	Asp	Phe	Tyr	Ile	Arg	Gln	Ile	Asn	Asn	Val	Ser	Ala	Met	Leu	Val	
		385				390					395				400		
	ctc	gcc	cgc	cgc	gtg	acg	ggc	ccc	cgc	gag	tac	gtg	ctg	gac	ctg	gag	1306
	Leu	Ala	Arg	Pro	Val	Thr	Gly	Pro	Arg	Glu	Tyr	Val	Leu	Asp	Leu	Glu	
				405					410					415			

atg gtc acc atg aat tcc ctc atg agc tac cgg gcc agc tct gta ctg 1354
 Met Val Thr Met Asn Ser Leu Met Ser Tyr Arg Ala Ser Ser Val Leu
 420 425 430

5 agg ctc acc gtc ttt gta ggg gcc tac acc ttc tgaggagcag gagggagcca 1407
 Arg Leu Thr Val Phe Val Gly Ala Tyr Thr Phe
 435 440

10 ccctccctgc agctacccta gctgaggagc ctgtgtgtgag gggcagaatg agaaaggcaa 1467
 taaagggaga aag 1480

15 <210> 22
 <211> 443
 <212> PRT
 <213> Séquence artificielle
 <223> Description de la séquence artificielle: MBP1
 humaine (séquence complète)

20 <400> 22
 Met Leu Pro Cys Ala Ser Cys Leu Pro Gly Ser Leu Leu Leu Trp Ala
 1 5 10 15

25 Leu Leu Leu Leu Leu Leu Gly Ser Ala Ser Pro Gln Asp Ser Glu Glu
 20 25 30

Pro Asp Ser Tyr Thr Glu Cys Thr Asp Gly Tyr Glu Trp Asp Pro Asp
 35 40 45

30 Ser Gln His Cys Arg Asp Val Asn Glu Cys Leu Thr Ile Pro Glu Ala
 50 55 60

35 Cys Lys Gly Glu Met Lys Cys Ile Asn His Tyr Gly Gly Tyr Leu Cys
 65 70 75 80

Leu Pro Arg Ser Ala Ala Val Ile Asn Asp Leu His Gly Glu Gly Pro
 85 90 95

40 Pro Pro Pro Val Pro Pro Ala Gln His Pro Asn Pro Cys Pro Pro Gly
 100 105 110

Tyr Glu Pro Asp Asp Gln Asp Ser Cys Val Asp Val Asp Glu Cys Ala
 115 120 125

45 Gln Ala Leu His Asp Cys Arg Pro Ser Gln Asp Cys His Asn Leu Pro
 130 135 140

50 Gly Ser Tyr Gln Cys Thr Cys Pro Asp Gly Tyr Arg Lys Ile Gly Pro
 145 150 155 160

Glu Cys Val Asp Ile Asp Glu Cys Arg Tyr Arg Tyr Cys Gln His Arg
 165 170 175

55 Cys Val Asn Leu Pro Gly Ser Phe Arg Cys Gln Cys Glu Pro Gly Phe
 180 185 190

Gln Leu Gly Pro Asn Asn Arg Ser Cys Val Asp Val Asn Glu Cys Asp
 195 200 205

Met Gly Ala Pro Cys Glu Gln Arg Cys Phe Asn Ser Tyr Gly Thr Phe
210 215 220

5 Leu Cys Arg Cys His Gln Gly Tyr Glu Leu His Arg Asp Gly Phe Ser
225 230 235 240

Cys Ser Asp Ile Asp Glu Cys Ser Tyr Ser Ser Tyr Leu Cys Gln Tyr
245 250 255

10 Arg Cys Val Asn Glu Pro Gly Arg Phe Ser Cys His Cys Pro Gln Gly
260 265 270

15 Tyr Gln Leu Leu Ala Thr Arg Leu Cys Gln Asp Ile Asp Glu Cys Glu
275 280 285

Ser Gly Ala His Gln Cys Ser Glu Ala Gln Thr Cys Val Asn Phe His
290 295 300

20 Gly Gly Tyr Arg Cys Val Asp Thr Asn Arg Cys Val Glu Pro Tyr Ile
305 310 315 320

Gln Val Ser Glu Asn Arg Cys Leu Cys Pro Ala Ser Asn Pro Leu Cys
325 330 335

25 Arg Glu Gln Pro Ser Ser Ile Val His Arg Tyr Met Thr Ile Thr Ser
340 345 350

30 Glu Arg Ser Val Pro Ala Asp Val Phe Gln Ile Gln Ala Thr Ser Val
355 360 365

Tyr Pro Gly Ala Tyr Asn Ala Phe Gln Ile Arg Ala Gly Asn Ser Gln
370 375 380

35 Gly Asp Phe Tyr Ile Arg Gln Ile Asn Asn Val Ser Ala Met Leu Val
385 390 395 400

Leu Ala Arg Pro Val Thr Gly Pro Arg Glu Tyr Val Leu Asp Leu Glu
405 410 415

40 Met Val Thr Met Asn Ser Leu Met Ser Tyr Arg Ala Ser Ser Val Leu
420 425 430

45 Arg Leu Thr Val Phe Val Gly Ala Tyr Thr Phe
435 440

50 <210> 23
<211> 817
<212> ADN
<213> Séquence artificielle

55 <220>
<223> Description de la séquence artificielle: cDNA MBP1
murine (séquence partielle)

<400> 23
gctgtggcag aaaccctga cttctgccca ccacctccca gcctcaggat gctccctttt 60

gacctcctgcc tccccgggtc tttgctgctc tgggctgttc tgctgttgct cttgggagca 120
 gcgtccccac aggatcccga ggagccggac agctacacgg aatgcacaga tggctatgag 180
 tgggatgcag acagccagca ctgccgggat gtcaacgagt gcctgaccat cccggaggct 240
 tgcaagggtg agatgaaatg catcaaccac tacgggggtt atttgtgtct gcctcgctct 300
 5 gctgccgtca tcagtgatct ccatggtgaa ggacctccac cgccagcggc ccatgctcaa 360
 caaccaaacc cttgcccga gggctacgag cctgatgaac aggagagctg tgtggatgtg 420
 gacgagtgtg cccaggcttt gcatgactgt cgccctagtc aggactgcca taaccttcct 480
 ggctcctacc agtgcacctg ccctgatggt taccgaaaaa ttggaccoga atgtgtggac 540
 atagatgagt gtcgttaccg ctattgccag catcgatgtg tgaacctgcc gggctctttt 600
 10 cgatgccagt gtgagccagg cttccagttg ggacctaaac accgctcttg tgtggatgtg 660
 aatgagtgtg acatgggagc cccatgtgag cagcgtgct tcaactccta tgggaccttc 720
 ctgtgtcgct gtaaccaggg ctatgagctg caccgggatg gcttctcctg cagcgatctc 780
 gatgagtgcg gctactccag ttacctctgc cagtacc 817

15 <210> 24
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Séquence artificielle

20 <220>
 <223> Description de la séquence artificielle:
 oligonucléotide sens-GAPDH

25 <400> 24
 cggagtcaac ggatttggtc gtat 24

30 <210> 25
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Séquence artificielle

35 <220>
 <223> Description de la séquence artificielle:
 oligonucléotide antisens -GAPDH

40 <400> 25
 agccttctcc atggtggtga agac 24

45 <210> 26
 <211> 25
 <212> ADN
 <213> Séquence artificielle

50 <220>
 <223> Description de la séquence artificielle:
 oligonucléotide

<400> 26
 cggttggcct tggggttcag ggggg 25

55 <210> 27
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Séquence artificielle

<223> Description de la séquence artificielle:
oligonucléotide sens MBP1

```
10      <210> 28
        <211> 21
        <212> ADN
        <213> Séquence artificielle
```

```
<400> 28
agcccccatg gaagttgaca c                21
```

25 <210> 29
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Séquence artificielle

<220>
<223> Description de la séquence artificielle:
oligonucléotide sens actine

```

      <400> 29
      .  gtggggcgcc ccaggcacca                                20

```

35 <210> 30
 <211> 1358
 <212> ADN
 <213> Séquence artificielle

```
40      <220>  
      <221> CDS  
      <222> (1) .. (885)
```

45 <220>
<223> Description de la séquence artificielle:
fragment C-term MBP1 humaine

50 <400> 30
tgc acc tgc cct gat ggt tac cgc aag atc ggg ccc gag tgt gtg gac 48
Cys Thr Cys Pro Asp Gly Tyr Arg Lys Ile Gly Pro Glu Cys Val Asp
 1 5 10 15

55

ata gac gag tgc cgc tac cgc tac tgc cag cac cgc tgc gtg aac ctg	96
Ile Asp Glu Cys Arg Tyr Arg Tyr Cys Gln His Arg Cys Val Asn Leu	
20 25 30	

cct ggc tcc ttc cgc tgc cag tgc gag ccg ggc ttc cag ctg ggg cct 144
Pro Gly Ser Phe Arg Cys Gln Cys Glu Pro Gly Phe Gln Leu Gly Pro
35 40 45

5	aac aac cgc tcc tgt gtt gat gtg aac gag tgt gac atg ggg gcc cca	192
	Asn Asn Arg Ser Cys Val Asp Val Asn Glu Cys Asp Met Gly Ala Pro	
	50 55 60	
10	tgc gag cag cgc tgc ttc aac tcc tat ggg acc ttc ctg tgt cgc tgc	240
	Cys Glu Gln Arg Cys Phe Asn Ser Tyr Gly Thr Phe Leu Cys Arg Cys	
	65 70 75 80	
15	cac cag ggc tat gag ctg cat cgg gat ggc ttc tcc tgc agt gat att	288
	His Gln Gly Tyr Glu Leu His Arg Asp Gly Phe Ser Cys Ser Asp Ile	
	85 90 95	
20	gat gag tgt agc tac tcc agc tac ctc tgt cag tac cgc tgc gtc aac	336
	Asp Glu Cys Ser Tyr Ser Ser Tyr Leu Cys Gln Tyr Arg Cys Val Asn	
	100 105 110	
25	gag cca ggc cgt ttc tcc tgc cac tgc cca cag ggt tac cag ctg ctg	384
	Glu Pro Gly Arg Phe Ser Cys His Cys Pro Gln Gly Tyr Gln Leu Leu	
	115 120 125	
30	gcc aca cgc ctc tgc caa gac att gat gag tgt gag tct ggt gcg cac	432
	Ala Thr Arg Leu Cys Gln Asp Ile Asp Glu Cys Glu Ser Gly Ala His	
	130 135 140	
35	cag tgc tcc gag gcc caa acc tgt gtc aac ttc cat ggg ggc tac cgc	480
	Gln Cys Ser Glu Ala Gln Thr Cys Val Asn Phe His Gly Gly Tyr Arg	
	145 150 155 160	
40	tgc gtg gac acc aac cgc tgc gtg gag ccc tac atc cag gtc tct gag	528
	Cys Val Asp Thr Asn Arg Cys Val Glu Pro Tyr Ile Gln Val Ser Glu	
	165 170 175	
45	aac cgc tgt ctc tgc ccg gcc tcc aac cct cta tgt cga gag cag cct	576
	Asn Arg Cys Leu Cys Pro Ala Ser Asn Pro Leu Cys Arg Glu Gln Pro	
	180 185 190	
50	tca tcc att gtg cac cgc tac atg acc atc acc tgc gag cgg agc gtg	624
	Ser Ser Ile Val His Arg Tyr Met Thr Ile Thr Ser Glu Arg Ser Val	
	195 200 205	
55	ccc gct gac gtg ttc cag atc cag gcg acc tcc gtc tac ccc ggt gcc	672
	Pro Ala Asp Val Phe Gln Ile Gln Ala Thr Ser Val Tyr Pro Gly Ala	
	210 215 220	
60	tac aat gcc ttt cag atc cgt gct gga aac tgc cag ggg gac ttt tac	720
	Tyr Asn Ala Phe Gln Ile Arg Ala Gly Asn Ser Gln Gly Asp Phe Tyr	
	225 230 235 240	
65	att agg caa atc aac aac gtc agc gcc atg ctg gtc ctc gcc cgg ccg	768
	Ile Arg Gln Ile Asn Asn Val Ser Ala Met Leu Val Leu Ala Arg Pro	
	245 250 255	
70	gtg acg ggc ccc cgg gag tac gtg ctg gac ctg gag atg gtc acc atg	816
	Val Thr Gly Pro Arg Glu Tyr Val Leu Asp Leu Glu Met Val Thr Met	
	260 265 270	
75	aat tcc ctc atg agc tac cgg gcc agc tct gta ctg agg ctc acc gtc	864
	Asn Ser Leu Met Ser Tyr Arg Ala Ser Ser Val Leu Arg Leu Thr Val	

275 280 285

5 ttt gta ggg gcc tac acc ttc tgaggagcag gagggagcca ccctccctgc 915
Phe Val Gly Ala Tyr Thr Phe
290 295

10 agctacccta gctgaggagc ctgttgtgag gggcagaatg agaaaggcaa taaagggaga 975
aagaaagtcc tgggtggctga ggtgggcggg tcacactgca ggaagcctca ggctggggca 1035
gggtggcact tgggggggca ggccaagtcc acctaaatgg gggctctctat atgttcaggc 1095
ccagggggccc ccattgacag gagctgggag ctctgcacca cgagcttcag tcaccccag 1155

15 aggagaggag gtaacgagga gggcggactc caggccccgg ccagagatt tggacttggc 1215
tggtctgcag gggctcctaag aaactccact ctggacagcg ccaggaggcc ctggggtcca 1275
ttcctaactc tgcctcaaac tgtacatttg gataagccct agtagtccc tgggcctgtt 1335

20 tttctataaaa acgaggcaac tgg 1358

25 <210> 31
<211> 295
<212> PRT
<213> Séquence artificielle
<223> Description de la séquence artificielle:
fragment C-term MBP1 humaine

30 <400> 31
Cys Thr Cys Pro Asp Gly Tyr Arg Lys Ile Gly Pro Glu Cys Val Asp
1 5 10 15

35 Ile Asp Glu Cys Arg Tyr Arg Tyr Cys Gln His Arg Cys Val Asn Leu
20 25 30

40 Pro Gly Ser Phe Arg Cys Gln Cys Glu Pro Gly Phe Gln Leu Gly Pro
35 40 45

45 Asn Asn Arg Ser Cys Val Asp Val Asn Glu Cys Asp Met Gly Ala Pro
50 55 60

50 Cys Glu Gln Arg Cys Phe Asn Ser Tyr Gly Thr Phe Leu Cys Arg Cys
65 70 75 80

55 His Gln Gly Tyr Glu Leu His Arg Asp Gly Phe Ser Cys Ser Asp Ile
85 90 95

Asp Glu Cys Ser Tyr Ser Ser Tyr Leu Cys Gln Tyr Arg Cys Val Asn
100 105 110

Glu Pro Gly Arg Phe Ser Cys His Cys Pro Gln Gly Tyr Gln Leu Leu
115 120 125

Ala Thr Arg Leu Cys Gln Asp Ile Asp Glu Cys Glu Ser Gly Ala His
130 135 140

Gln Cys Ser Glu Ala Gln Thr Cys Val Asn Phe His Gly Gly Tyr Arg

145 150 155 160
 Cys Val Asp Thr Asn Arg Cys Val Glu Pro Tyr Ile Gln Val Ser Glu
 165 170 175
 5 Asn Arg Cys Leu Cys Pro Ala Ser Asn Pro Leu Cys Arg Glu Gln Pro
 180 185 190
 10 Ser Ser Ile Val His Arg Tyr Met Thr Ile Thr Ser Glu Arg Ser Val
 195 200 205
 Pro Ala Asp Val Phe Gln Ile Gln Ala Thr Ser Val Tyr Pro Gly Ala
 210 215 220
 15 Tyr Asn Ala Phe Gln Ile Arg Ala Gly Asn Ser Gln Gly Asp Phe Tyr
 225 230 235 240
 Ile Arg Gln Ile Asn Asn Val Ser Ala Met Leu Val Leu Ala Arg Pro
 245 250 255
 20 Val Thr Gly Pro Arg Glu Tyr Val Leu Asp Leu Glu Met Val Thr Met
 260 265 270
 25 Asn Ser Leu Met Ser Tyr Arg Ala Ser Ser Val Leu Arg Leu Thr Val
 275 280 285
 Phe Val Gly Ala Tyr Thr Phe
 290 295
 30
 <210> 32
 <211> 1663
 <212> ADN
 35 <213> Séquence artificielle

 <220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(999)
 40
 <220>
 <223> Description de la séquence artificielle: fragment
 c-term fibuline 2 murine
 45 <400> 32
 gag ggc tct gaa tgt gtg gat gtg aat gag tgt gag aca ggt gtg cat 48
 Glu Gly Ser Glu Cys Val Asp Val Asn Glu Cys Glu Thr Gly Val His
 1 5 10 15
 50 cgc tgt ggc gag ggc caa ctg tgc tat aac ctc cct gga tcc tac cgc 96
 Arg Cys Gly Glu Gly Gln Leu Cys Tyr Asn Leu Pro Gly Ser Tyr Arg
 20 25 30
 55 tgt gac tgc aag ccc ggc ttc cag agg gat gca ttc ggc agg act tgc 144
 Cys Asp Cys Lys Pro Gly Phe Gln Arg Asp Ala Phe Gly Arg Thr Cys
 35 40 45
 att gat gtg aac gaa tgc tgg gtc tcg ccg ggc cgc ctg tgc cag cac 192
 Ile Asp Val Asn Glu Cys Trp Val Ser Pro Gly Arg Leu Cys Gln His

	50	55	60	
5	aca tgt gag aac aca ccg ggc tcc tac cgc tgc tcc tgc gct gct ggc Thr Cys Glu Asn Thr Pro Gly Ser Tyr Arg Cys Ser Cys Ala Ala Gly 65 70 75 80	240		
10	ttc ctt ttg gcc gca gat ggc aaa cat tgt gaa gat gtg aac gag tgc Phe Leu Leu Ala Ala Asp Gly Lys His Cys Glu Asp Val Asn Glu Cys 85 90 95	288		
15	gag act cgg cgc tgc agc cag gaa tgt gcc aac atc tat ggc tcc tat Glu Thr Arg Arg Cys Ser Gln Glu Cys Ala Asn Ile Tyr Gly Ser Tyr 100 105 110	336		
20	cag tgc tac tgc cgt cag ggc tac cag ctg gca gag gat ggg cat acc Gln Cys Tyr Cys Arg Gln Gly Tyr Gln Leu Ala Glu Asp Gly His Thr 115 120 125	384		
25	tgc aca gac atc gat gag tgt gca cag ggc gcg ggc att ctc tgt acc Cys Thr Asp Ile Asp Glu Cys Ala Gln Gly Ala Gly Ile Leu Cys Thr 130 135 140	432		
30	ttc cgc tgt gtc aac gtg cct ggg agc tac cag tgt gca tgc cca gag Phe Arg Cys Val Asn Val Pro Gly Ser Tyr Gln Cys Ala Cys Pro Glu 145 150 155 160	480		
35	caa ggg tat aca atg atg gcc aac ggg agg tcc tgc aag gac ctg gat Gln Gly Tyr Thr Met Met Ala Asn Gly Arg Ser Cys Lys Asp Leu Asp 165 170 175	528		
40	gag tgt gca ctg ggc acc cac aac tgc tct gag gct gag acc tgc cac Glu Cys Ala Leu Gly Thr His Asn Cys Ser Glu Ala Glu Thr Cys His 180 185 190	576		
45	aat atc cag ggg agt ttc cgc tgc ctg cgc ttt gat tgt cca ccc aac Asn Ile Gln Gly Ser Phe Arg Cys Leu Arg Phe Asp Cys Pro Pro Asn 195 200 205	624		
50	tat gtc cgt gtc tca caa acg aag tgc gag cgc acc aca tgc cag gat Tyr Val Arg Val Ser Gln Thr Lys Cys Glu Arg Thr Thr Cys Gln Asp 210 215 220	672		
55	atc acg gaa tgt caa acc tca cca gct cgc atc acg cac tac cag ctc Ile Thr Glu Cys Gln Thr Ser Pro Ala Arg Ile Thr His Tyr Gln Leu 225 230 235 240	720		
60	aat ttc cag aca ggc cta ctg gta cct gca cat atc ttc cgc atc ggc Asn Phe Gln Thr Gly Leu Leu Val Pro Ala His Ile Phe Arg Ile Gly 245 250 255	768		
65	cct gct ccc gcc ttt gct ggg gac acc atc tcc ctg acc atc acg aag Pro Ala Pro Ala Phe Ala Gly Asp Thr Ile Ser Leu Thr Ile Thr Lys 260 265 270	816		
70	ggc aat gag gag ggc tac ttc gtc aca cgc aga ctc aat gcc tac act Gly Asn Glu Glu Gly Tyr Phe Val Thr Arg Arg Leu Asn Ala Tyr Thr 275 280 285	864		
75	ggt gtg gta tcc ctg cag cgg tct gtt ctg gag ccg cgg gac ttt gcc	912		

Gly Val Val Ser Leu Gln Arg Ser Val Leu Glu Pro Arg Asp Phe Ala
 290 295 300

5 cta gat gtg gag atg aag ctt tgg cgc cag ggc tct gtc act acc ttc 960
 Leu Asp Val Glu Met Lys Leu Trp Arg Gln Gly Ser Val Thr Thr Phe
 305 310 315 320

10 ctg gcc aag atg tac atc ttc ttc acc act ttt gcc cca tgaggtagaca 1009
 Leu Ala Lys Met Tyr Ile Phe Phe Thr Thr Phe Ala Pro
 325 330

15 tgtcaggcaa tccctccagg tgatgcctgg gcggtgggca gctgcgccac tccctaagtgg 1069
 ctttttgctg tgactctgta acttaactta atcatgctga gctgggttggc cttgagtctc 1129
 taccctagag ggagggagat gcaccccagc aggactgag tacaggccag ggtcaccoga 1189
 ggctagatgg tgacctgcaa actggaaaaca gccatagggg gcttctgaac tccactcctc 1249

20 aactatggct acagctgaca ttccattcct tcatccactg tgttcctcaa ttaaaaaaaaa 1309
 aaatcagctg tgcattgtag cacagacctt taatcctagc actggggagg cagaggtagg 1369
 25 tagatctctg agttccaggc cagcctgggc tacactggga gttctaacca gccagagcta 1429
 catagagaga ccttatctca acaaggaaaa aacgaaagaa atctctgtga gttccaggcc 1489
 agcctgggtc acgctgggag ttctaaccag ccagagctac atagagagat ccttatctcaa 1549

30 caaggaaaaa tgaaagaaat cattttaaaa ggtttttttt tttgctgttg ttgtttaatg 1609
 ataagagtag cacatataca ttattaaaaa tgatcaaata gcacagaaag gtta 1663

35 <210> 33
 <211> 333
 <212> PRT
 <213> Séquence artificielle
 <223> Description de la séquence artificielle: fragment

40 c-term fibuline 2 murine

45 <400> 33
 Glu Gly Ser Glu Cys Val Asp Val Asn Glu Cys Glu Thr Gly Val His
 1 5 10 15
 Arg Cys Gly Glu Gly Gln Leu Cys Tyr Asn Leu Pro Gly Ser Tyr Arg
 20 25 30
 50 Cys Asp Cys Lys Pro Gly Phe Gln Arg Asp Ala Phe Gly Arg Thr Cys
 35 40 45
 Ile Asp Val Asn Glu Cys Trp Val Ser Pro Gly Arg Leu Cys Gln His
 50 55 60
 55 Thr Cys Glu Asn Thr Pro Gly Ser Tyr Arg Cys Ser Cys Ala Ala Gly
 65 70 75 80
 Phe Leu Leu Ala Ala Asp Gly Lys His Cys Glu Asp Val Asn Glu Cys
 85 90 95

Glu Thr Arg Arg Cys Ser Gln Glu Cys Ala Asn Ile Tyr Gly Ser Tyr
 100 105 110

5 Gln Cys Tyr Cys Arg Gln Gly Tyr Gln Leu Ala Glu Asp Gly His Thr
 115 120 125

Cys Thr Asp Ile Asp Glu Cys Ala Gln Gly Ala Gly Ile Leu Cys Thr
 130 135 140

10 Phe Arg Cys Val Asn Val Pro Gly Ser Tyr Gln Cys Ala Cys Pro Glu
 145 150 155 160

15 Gln Gly Tyr Thr Met Met Ala Asn Gly Arg Ser Cys Lys Asp Leu Asp
 165 170 175

Glu Cys Ala Leu Gly Thr His Asn Cys Ser Glu Ala Glu Thr Cys His
 180 185 190

20 Asn Ile Gln Gly Ser Phe Arg Cys Leu Arg Phe Asp Cys Pro Pro Asn
 195 200 205

Tyr Val Arg Val Ser Gln Thr Lys Cys Glu Arg Thr Thr Cys Gln Asp
 210 215 220

25 Ile Thr Glu Cys Gln Thr Ser Pro Ala Arg Ile Thr His Tyr Gln Leu
 225 230 235 240

30 Asn Phe Gln Thr Gly Leu Leu Val Pro Ala His Ile Phe Arg Ile Gly
 245 250 255

Pro Ala Pro Ala Phe Ala Gly Asp Thr Ile Ser Leu Thr Ile Thr Lys
 260 265 270

35 Gly Asn Glu Glu Gly Tyr Phe Val Thr Arg Arg Leu Asn Ala Tyr Thr
 275 280 285

Gly Val Val Ser Leu Gln Arg Ser Val Leu Glu Pro Arg Asp Phe Ala
 290 295 300

40 Leu Asp Val Glu Met Lys Leu Trp Arg Gln Gly Ser Val Thr Thr Phe
 305 310 315 320

45 Leu Ala Lys Met Tyr Ile Phe Phe Thr Thr Phe Ala Pro
 325 330

50